

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1895

THÈSE

N°

491

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le 24 juillet 1895, à 1 heure

PAR

LOUIS LAPICQUE

Né à Épinal (Vosges), le 1^{er} août 1866

LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES,
CHEF DU LABORATOIRE DE LA CLINIQUE MÉDICALE DE L'HÔTEL-DIEU,
MEMBRE DE LA SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE.

SUR LE DOSAGE DU FER

DANS LES

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES

Président : M. A. GAUTIER.

*Juges : MM. { GLEY.
 { HANRIOT.
 { ANDRÉ.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

SOCIÉTÉ ANONYME AU CAPITAL DE 135,000 FRANCS

1, RUE CASSETTE, 1

1895

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Année 1895

THÈSE

N°

POUR

LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue le 24 juillet 1895, à 1 heure

PAR

LOUIS LAPICQUE

Né à Épinal (Vosges), le 1^{er} août 1866

LICENCIÉ ÈS SCIENCES NATURELLES,

CHEF DU LABORATOIRE DE LA CLINIQUE MÉDICALE DE L'HÔTEL-DIEU,

MEMBRE DE LA SOCIÉTÉ DE BIOLOGIE.

SUR LE DOSAGE DU FER

DANS LES

RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES

Président : M. A. GAUTIER.

*Juges : MM. { GLEY.
HANRIOT.
ANDRÉ.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

SOCIÉTÉ ANONYME AU CAPITAL DE 135,000 FRANCS

1, RUE CASSETTE, 1

1895

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

	Doyen.	M. BROUARDEL.
	Professeurs	MM.
Anatomie		FARABEUF.
Physiologie		Ch. RICHET.
Physique médicale		GABRIEL.
Chimie organique et chimie minérale		GAUTIER.
Histoire naturelle médicale		BAILLON.
Pathologie et thérapeutique générales		BOUCHARD.
Pathologie médicale		DIEULAFOY.
		DEBOVE.
Pathologie chirurgicale		LANNELONGUE.
Anatomie pathologique		CORNIL.
Histologie		MATHIAS DUVAL.
Opérations et appareils		TERRIER.
Pharmacologie		POUCHET.
Thérapeutique et matière médicale		LANDOUZY.
Hygiène		PROUST.
Médecine légale		BROUARDEL.
Histoire de la médecine et de la chirurgie		LABOULBENE.
Pathologie expérimentale et comparée		STRAUS.
		G. SEE.
Clinique médicale		POTAIN.
		JACCOUD.
		HAYEM.
		GRANCHER.
Maladies des enfants		JOFFROY.
Clinique de pathologie mentale et des maladies de l'encéphale		FOURNIER.
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques		RAYMOND.
Clinique des maladies du système nerveux		DUPLAY.
Clinique chirurgicale		LE DENTU.
		TILLAUX.
		BERGER.
Clinique des maladies des voies urinaires		GUYON.
Clinique ophthalmologique		PANAS.
Clinique d'accouchements		TARNIER.
		PINARD.

Professeurs honoraires :

MM. SAPPEY, PAJOT, VERNEUIL.

Agrévés en exercice :

MM. ALBARRAN	MM. DELBET	MM. MARIE	MM. RICARD
ANDRE	FAUCONNIER	MAYGRIER	ROGER
BALLET	GAUCHER	MENETRIER	SCHWARTZ
BAR.	GILBERT	NELATON	SEBILÉAU
BRISAUD	GLEYS	NETTER	TUFFIER
BRUN	HEIM	POIRIER, chef	VARNIER
CHANTEMESSE	JALAGUIER	des travaux	VILLEJEAN
CHARRIN	LEJARS	anatomiques	WEISS
CHAUFFARD	LETULLE	QUENU	
DEJERINE	MARFAN	RETTERRER	

Secrétaire de la Faculté : M. Ch. PUPIN.

Par délibération en date du 9 décembre 1798, l'Ecole a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner aucune approbation ni improbation

A MON CHER MAITRE ET AMI

EUGÈNE GLEY

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS
ASSISTANT AU MUSÉUM

MON CHER AMI,

J'aurais voulu inscrire votre nom en tête d'un travail plus digne de vous. Veuillez accepter la dédicace de celui-ci, quelque modeste soit-il. On a rarement l'occasion de témoigner publiquement sa reconnaissance envers ses maîtres. Puisque l'usage me le permet aujourd'hui, laissez-moi vous dire tout le respect et toute l'affection que j'ai pour vous. Depuis douze ans, vous m'avez constamment guidé et encouragé de votre amitié ferme et éclairée; vous m'avez communiqué cette ardente et sincère curiosité qui fait tout le prix de la vie; vous m'avez enseigné la foi en la seule expérience, la critique rigoureuse, la patience au travail, qui me permettront peut-être d'apporter ma pierre au grand œuvre de la science. Faites-moi crédit et permettez-moi, à propos de cette thèse, qui marque, non pas la fin, mais une étape de mes études, de vous rendre l'hommage de ce que je pourrai valoir et qui viendra de vous.

A MON CHER MAITRE

GERMAIN SÉE

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

J'offre, avec l'assurance respectueuse de mon dévouement, mes remerciements sincères pour la bienveillance qu'il m'a témoignée depuis huit ans que j'ai l'honneur de travailler dans son laboratoire de l'Hôtel-Dieu.

J'ai contracté de grandes dettes de reconnaissance envers
les Maîtres dont je mets ici, respectueusement, les noms.

M. CHARLES RICHET

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

M. DE LACAZE-DUTHIERS

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

M. FRIEDEL

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

M. HANRIOT

PROFESSEUR AGRÉGÉ

CHEF DES TRAVAUX DE CHIMIE A LA FACULTÉ DE MÉDECINE
DE PARIS

A M. ARMAND GAUTIER

MEMBRE DE L'INSTITUT

PROFESSEUR A LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

Je présente mes respectueux remerciements pour le grand
honneur qu'il m'a fait d'accepter la présidence de cette thèse.

SUR LE DOSAGE DU FER

DANS LES RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES

INTRODUCTION

LA QUESTION PHYSIOLOGIQUE DU FER

Parmi les éléments chimiques qui font partie de la constitution des vertébrés, le fer mérite une place à part, en même temps par son importance physiologique, qui est de premier ordre, et par sa proportion centésimale, qui est tout à fait minime.

Dans le corps d'un homme, par exemple, en donnant des chiffres simplement schématiques, nous trouvons pour un poids total de 65 kilogrammes environ 25 kilogrammes de matière sèche; la quantité totale de fer contenue dans cet organisme est, d'après les données classiques, de 4 grammes environ, quantité qu'il faut réduire à 3 grammes et même 2 grammes et demi d'après les estimations récentes de BUNGE (1). Ce qui nous donne une proportion de *un dix-millième* de fer dans la masse totale des substances sèches du corps humain, et de *un vingt-cinq-millième* pour l'organisme vivant.

(1) XIII^e Congrès de médecine interne, tenu à Munich du 2 au 5 avril 1895. Compte rendu in *Münchener medicinische Wochenschrift*, 1895, n^o 15, p. 357. — Dans son *Traité de Chimie physiologique*, Bunge donne 3 gr. 1 à 3 gr. 3 pour un homme de 70 kilogrammes (p. 84, 2^e éd.). Ce chiffre nous paraît devoir être admis de préférence au chiffre classique, nous en donnerons la raison dans le cours de ce travail, en même temps que nous essaierons d'expliquer l'écart entre les deux estimations.

Cette petite quantité de fer est tout à fait nécessaire, comme on pourrait l'établir en montrant qu'elle ne fait défaut chez aucun vertébré, si ce n'est chez l'*Amphioxus* qui d'ailleurs n'est pas un vertébré véritable, mais seulement un proto-vertébré. Mais nous savons directement que le fer joue un rôle spécial dans les échanges vitaux et que ce rôle est capital. Le fer entre dans la molécule de l'hémoglobine, de cette matière qui donne au sang sa couleur rouge, matière grâce à laquelle le milieu intérieur peut prendre dans les poumons ou dans les branchies de l'oxygène qu'il porte ensuite à tous les tissus.

Nous ne voulons pas retracer ici le rôle de l'oxygène dans les processus vitaux; nous rappellerons seulement que tous les tissus ont besoin pour leur fonctionnement d'oxygène dont ils font une consommation incessante, bien que divers processus aient lieu par un mécanisme anaérobie. Cet oxygène, ils ne le prennent pas à l'air atmosphérique, mais au sang qui les baigne; celui-ci contient une quantité d'oxygène disponible, incomparablement plus grande que la quantité qu'il pourrait absorber par simple dissolution; 100 volumes d'eau distillée dissolvent 3 volumes d'oxygène à 15 degrés sous la tension d'une atmosphère; la tension de l'oxygène dans l'air n'étant que d'un cinquième d'atmosphère, la solution saturée dans ces conditions n'en contiendrait que 0 vol. 6, à 15 degrés, et moins encore à 37 degrés. Or, 100 volumes de sang (homme, chien, bœuf) préalablement agités à l'air, cèdent à l'hydrosulfite de soude ou perdent par l'action combinée de la chaleur et du vide 20 à 25 volumes d'oxygène.

Cette propriété d'absorber et de céder facilement des grandes quantités d'oxygène, le sang la doit à l'hémoglobine qui forme les 90 centièmes des globules sanguins et le neuvième environ du sang total.

L'hémoglobine, en effet, jouit de la propriété de former avec l'oxygène une combinaison instable. Une solution d'hémoglobine qui est pourpre foncé, agitée à l'air devient presque instantanément d'un rouge vermeil; l'addition d'une substance réductrice, sulfure d'ammonium, hydro-sulfite de soude, ramène instantanément la solution à son premier état. C'est d'une combinaison définie qu'il s'agit; un poids donné d'hémoglobine se combine à un poids donné d'oxygène pour former un corps nouveau, nommé oxyhémoglobine.

L'oxyhémoglobine étant cristallisable, on peut l'obtenir pure, et par suite obtenir aussi l'hémoglobine pure. On a donc pu en établir par des analyses, sinon la formule, du moins la composition centésimale. Jusqu'ici nous avons dit : l'hémoglobine comme s'il n'en existait qu'une, et nous pouvons le faire en nous plaçant au point de vue de la physiologie générale; cependant, il existe plusieurs hémoglobines, peut-être une hémoglobine distincte pour chaque espèce animale. Chacune de ces hémoglobines se distingue par sa facilité plus ou moins grande à cristalliser, par la forme de ses cristaux, aussi par sa composition; mais toutes ces hémoglobines se ressemblent par la plupart de leurs propriétés, et leurs compositions, quoique distinctes, sont très voisines les unes des autres. Ce sont des matières albuminoïdes, qui se font remarquer tout d'abord par ce fait qu'elles contiennent du *fer* dans leurs molécules. Nous ne nous encomberrons pas ici des chiffres relatifs au carbone, à l'hydrogène, à l'azote, à l'oxygène, au soufre, éléments qui leur sont communs avec toutes les matières albuminoïdes. Mais nous examinerons brièvement les études faites sur leur teneur en fer.

Jusqu'à ces dix dernières années, on admettait une proportion de fer d'environ 0,4 à 0,5 p. 100. LAMBLING dans

sa thèse (1) donne le tableau suivant relevé dans les travaux de divers auteurs.

Homme et bœuf	0,42
Chien	0,43
Cheval	0,47
Cochon d'Inde	0,48
Écureuil	0,59
Oie	0,43

Mais BUNGE a fait reprendre par ses élèves, avec beaucoup de soin, l'étude de la composition de l'hémoglobine, et ces recherches ont conduit à des chiffres sensiblement plus faibles.

Zinoffsky (2) a trouvé dans l'hémoglobine du cheval 0,336 de fer p. 100. A. Jaquet a trouvé dans celle du chien d'abord 0,333 p. 100 (3), chiffre extrêmement voisin du précédent; puis, en reprenant son travail sur nouveaux frais 0,336, c'est-à-dire identiquement la même proportion que chez le cheval (4). Dans l'hémoglobine de la poule, Jaquet (5) a trouvé encore une proportion de fer aussi égale que possible aux précédentes, à savoir 0,3353 p. 100.

Ces trois hémoglobines qui contiennent ainsi la même proportion de fer, sont pourtant distinctes, ainsi qu'il ressort nettement de leur analyse élémentaire, qu'il est inutile de rapporter ici. Mais elles contiennent incontestablement la même quantité de fer. Les produits analysés,

(1) *Des procédés de dosage de l'hémoglobine*. Nancy, 1882.

(2) Diss. inaug., Dorpat, 1885 et *Zeitschrift f. physiol. Chemie*, t. X; analysé dans le *Jahresbericht de Maly*, 1885, p. 131.

(3) *Elementaranalyse des Hundebloodhämoglobins*, analysé dans le *Jahresb. de Maly*, 1888, p. 53.

(4) *Beiträge zur Kenntniss des Blutfarbstoffes*, Diss. inaug., Bâle, 1889, analysé dans le *Jahresb. de Maly*, 1889, p. 501.

(5) *Ibidem*.

recristallisés trois fois, étaient sans doute aussi purs qu'il est possible de les obtenir; le dosage du fer a été exécuté suivant des méthodes directes, par pesées théoriquement, irréprochables; la troisième décimale elle-même donnée par les auteurs correspond à une précision réelle, et non à une fantaisie arithmétique. Les auteurs ont fait en effet leurs opérations sur des quantités considérables d'hémoglobine, jusqu'à 60 grammes.

Il y a comme on voit, un désaccord assez sensible entre ces recherches et les chiffres classiques.

Pour le moment, contentons-nous de noter ce désaccord et revenons au rôle physiologique du fer, pour lequel il importe assez peu que sa proportion dans l'hémoglobine soit de 3 ou soit de 4 millièmes. L'important, c'est que le fer fait partie intégrante de l'hémoglobine. Et comme toute la physiologie des vertébrés suppose un apport constant d'oxygène par l'hémoglobine du sang, si vous retirez par hypothèse de l'organisme ce fer qui n'y entre que dans la proportion d'un vingt-cinq millième, c'est, au moins pour un animal à sang chaud, la mort immédiate.

En fait, nous constatons, par l'expérience de tous les jours, les conséquences graves qu'entraîne pour l'organisme la diminution de ce fer : c'est l'*anémie*. Nous ne voulons pas parler de la soustraction d'une partie notable du sang contenu dans les vaisseaux, le problème est dans ce cas très compliqué. Mais dans l'anémie au sens médical du mot, la masse du sang n'est sans doute nullement changée; sa composition ne semble pas non plus modifiée sensiblement, si ce n'est précisément quant à la teneur en hémoglobine. On sait que c'est là une lésion des plus graves; la vie est encore possible avec une diminution assez forte d'hémoglobine, mais il se produit des troubles manifestes quand cette diminution atteint seulement le

quart de la quantité normale. Quand elle atteint la moitié de cette quantité, la vie active est impossible, et quand elle dépasse les quatre cinquièmes, c'est la mort.

L'organisme possède des moyens de défense énergiques contre ce danger ; bien des causes peuvent amener une perte de sang ; l'anémie qui résulte de cette perte, sur un animal en bonne santé par ailleurs, est toute transitoire et se trouve bien vite réparée. Après une saignée, la teneur du sang en globules et en hémoglobine est diminuée, parce que la partie liquide du sang perdu a d'abord été seule remplacée et qu'il s'est fait ainsi une dilution des globules restants, mais au bout de quelques jours le taux en hémoglobine est revenu à la normale.

On sait même depuis quelques années (et des expériences toutes récentes viennent de préciser la question), que ce taux d'hémoglobine, qui est assez constant pour une espèce donnée dans les conditions normales, peut varier par adaptation à des conditions respiratoires nouvelles.

VIAULT avait montré que le nombre des globules est augmenté dans le sang de l'homme et des animaux qui vivent à de grandes altitudes ; de divers côtés, le fait a été confirmé. L'explication par l'adaptation à une moindre tension de l'oxygène avait été donnée dès le premier abord, mais c'était une hypothèse qui demandait vérification ; elle pouvait être contestée, et elle le fut.

Vaquez reconnut que dans la *cyanose* chronique, c'est-à-dire quand une malformation cardiaque, vasculaire ou respiratoire met obstacle à l'hématose, il y a constamment *hyperglobulie* ; le nombre des globules, et parallèlement la quantité d'hémoglobine, déterminée colorimétriquement, sont sensiblement au-dessus de la normale. Le fait a été contrôlé et confirmé par Marie, Hayem, Variot et Richardière.

On peut d'ailleurs, sur les animaux, reproduire l'hyperglobulie de la cyanose; en mettant ces animaux dans des conditions analogues à celles des malades, l'on voit ainsi cette hyperglobulie compensatrice se produire rapidement. J'ai eu moi-même l'occasion d'observer à l'Hôtel-Dieu le cas de M. Marie; sur la demande de celui-ci, j'avais, avec M. Auscher, examiné le sang d'un cyanotique, et nous avons constaté l'hyperglobulie à un degré très marqué. Nous avons eu l'idée de chercher à éclaircir expérimentalement ce curieux mécanisme. Une première expérience nous a donné un résultat assez net. Sur un chien, nous avons pratiqué un pneumothorax aseptique du côté droit, supprimant ainsi au point de vue fonctionnel le poumon droit tout entier. A la suite de l'opération, la santé de l'animal s'étant d'ailleurs maintenue bonne malgré la dyspnée persistante, nous avons vu le nombre des globules qui était de 5,336,000 passer en vingt jours à 6,480,000 par millimètre cube; en même temps, la proportion de fer dans le sang, pour 1,000, passait de 0,35 à 0,45 (1).

JOLYET et SELLIER, en plaçant une poule dans un état d'asphyxie subaiguë par rétrécissement de la trachée, ont vu le nombre de ses globules passer *en 36 heures* de 3,069,000 à 3,617,000 (2).

Ces deux auteurs ont d'ailleurs fixé le déterminisme externe de cette adaptation spéciale; par une série d'expériences ingénieusement variées, ils ont démontré que c'est bien la *diminution de tension de l'oxygène* dans l'air inspiré qui provoque l'hyperglobulie (3).

L'ensemble de ces observations et de ces expériences nous paraît démontrer qu'il existe chez les vertébrés supé-

(1) E. AUSCHER et L. LAPICQUE. Soc. de Biologie, 25 mai 1895.

(2) Soc. de Biologie, 18 mai 1895.

(3) SELLIER. Thèse de Bordeaux, 1895.

rieurs tout un mécanisme de la régulation pour la teneur du sang en hémoglobine.

Si nous avons un peu insisté sur ce point, c'est que nous tenions à bien poser que cette composition du sang, le nombre des globules, la proportion d'hémoglobine, de fer, n'est point une donnée statique, anatomique, mais bien une donnée dynamique, physiologique, nous dirions presque *une fonction*.

L'étude de cette fonction si importante est, dans son ensemble, à faire. De l'hémopoïèse, nous ne connaissons (et encore assez incomplètement) que le côté histologique; nous savons à peu près comment se forment les globules qui vont être les vecteurs de l'hémoglobine; nous ne savons pas où ils prennent cette hémoglobine.

Ce n'est pas que les travaux manquent sur la matière; la bibliographie en est énorme, et pourtant, il est impossible, actuellement, d'édifier une théorie de l'hémopoïèse chimique; les points les plus essentiels sont encore entourés d'obscurités, de contradictions; à chaque pas, on rencontre une lacune. Nous allons essayer de passer en revue rapidement la question, simplement pour donner une idée de la quantité de recherches qui restent à faire sur les mutations du fer organique.

Dans l'état de santé, l'hémoglobine d'un animal adulte est une quantité constante. Est-ce toujours la même hémoglobine qui indéfiniment s'oxygène dans le poumon et se réduit dans les organes? Cela est peu probable; par la vie, tout s'use. D'ailleurs, des considérations chimiques, précises, portent à admettre que les pigments biliaires, (qui ne sont pas ferrugineux), dérivent de l'hémoglobine; celle-ci doit donc se détruire chaque jour en quantité notable pour fournir ces dérivés. Mais alors, que devient le fer de la molécule détruite? On avait admis que ce fer

s'en allait aussi par la bile. Les dosages de fer effectués sur la bile ont donné des chiffres très disparates, peu faits pour inspirer confiance; les plus récents n'y ont trouvé que des quantités de fer tout à fait minimales.

Finalement BUNGE en opérant sur de grandes quantités de bile de veau, de porc, de chien et d'homme n'a jamais trouvé que des traces impondérables de fer (1).

Ce fer se dépose-t-il dans un organe pour être employé de nouveau à l'hémopoïèse? Quel est cet organe? Il semble bien qu'il doive exister quelque part une réserve organique de fer, sinon pour la rénovation journalière de l'hémoglobine, du moins pour la reconstitution de la quantité normale que nous avons vu s'effectuer après la saignée.

Où est cette réserve, si elle existe ?

Elle existe en tout cas chez le nouveau-né. BUNGE en a démontré la nécessité et la réalité. Un petit lapin, tué aussitôt après sa naissance, contient une proportion de fer de 0,120 p. 1,000 du poids, total de l'organisme : chez un petit lapin de quatorze jours, cette proportion est réduite à 0,044. De même, chez un chien, âgé de dix heures, en trouve 0,112 de fer p. 1,000 du poids corporel; chez un chien de la même portée, âgé de quatre jours, ce chiffre est déjà descendu à 0,075 (2). Dans quel organe ou dans quels organes est cette réserve? ZALESKI (3) a trouvé dans le foie d'un chien nouveau-né, foie rendu exsangue par le lavage intravasculaire 3,91 de fer p. 1000 de substance sèche; les foies de deux chiens adultes analysés dans les mêmes conditions ne lui ont donné que 0,78 et

(1) *Lehrb. d. physiol. Chemie*, p. 88.

(2) BUNGE. *Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie*, 2^e éd., p. 99.

(3) *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, t. X, 1886. p. 453.

0,43 p. 1,000. Il était donc indiqué de chercher dans le foie la réserve de fer des nouveau-nés, J'ai fait moi-même un assez grand nombre d'analyses dans ce but (1); chez le chien, chez le lapin, chez ce dernier animal particulièrement, j'ai trouvé en effet, d'une façon générale, une forte proportion de fer, quelquefois même très forte, jusqu'à 1,74 p. 1,000 de foie frais, ce qui ferait environ 8 p. 1,000 de foie sec. Mais j'ai trouvé aussi, chez des animaux de la même portée, des différences considérables, du simple au quintuple, qui demandent à être expliquées. Enfin chez un fœtus humain normal, mort accidentellement au cours même de l'accouchement, j'ai trouvé dans le foie une proportion de fer tout à fait minime qui ne pouvait nullement constituer une réserve.

Dans le foie des chiens adultes, on observe d'un animal à l'autre, quant à la proportion de fer, des différences considérables qu'on ne sait à quoi rattacher; la quantité de fer est d'ailleurs généralement faible. La rate présente une teneur plus élevée. Partant de là, on a voulu faire de cet organe le véritable facteur de l'hémopoïèse chimique. Mais d'autres auteurs considèrent que le fer de la rate, bien loin d'être une réserve, est un déchet.

Chez les jeunes animaux, j'ai constaté, contrairement à ce qu'on aurait pu attendre, que la rate contient extrêmement peu de fer (2). Ce fait est favorable à la seconde des deux opinions. Mais ces deux opinions sont-elles aussi diamétralement opposées qu'il semble et s'excluent-elles l'une l'autre ?

Nous ne savons pas s'il y a lieu de distinguer du fer de déchet le fer de réserve; le fer qui provient de la démolition

(1) LOUIS LAPICQUE. Soc. de Biologie, 22 juin 1889; 20 juillet 1889; 16 juillet 1892; 19 janvier 1895.

(2) LOUIS LAPICQUE. Voir Soc. de Biologie, aux dates citées ci-dessus.

d'une molécule d'hémoglobine ne peut-il pas servir à la construction d'une nouvelle molécule ?

L'existence même, d'ailleurs, d'une réserve de fer qui est nécessaire au nouveau-né, n'est pas absolument nécessaire à l'adulte. Elle n'est pas démontrée par l'expérience. On peut tout aussi bien considérer un circulus analogue à celui que présentent plus ou moins tous les composants de l'organisme, c'est-à-dire une absorption alimentaire et une élimination excrémentitielle. Mais cette absorption et cette élimination si elles paraissent bien exister, sont encore entourées d'une obscurité profonde,

On a commencé, entraîné par l'analogie, par étudier l'urine pour se renseigner sur l'élimination du fer. Il y a un demi-siècle, on était d'accord pour admettre que l'urine normale ne contient pas de fer (1). On est arrivé peu à peu à se confirmer dans l'opinion contraire, à savoir que par l'urine s'éliminent chaque jour un certain nombre de milligrammes de fer (2). Jusqu'à ces dernières années le fait semblait acquis. En 1891, un travail du laboratoire de BUNGE aboutit au contraire à une conclusion presque négative : l'urine du chien filtrée ne contient que des traces impondérables de fer (3). J'ai repris la question chez l'homme, et dans les urines d'hommes sains et de divers malades, je n'ai jamais trouvé que des traces impondérables de fer (4). DAMASKIN déclare que le fer de l'urine de l'homme est parfaitement pondérable, mais les quantités qu'il a trouvées sont souvent inférieures à 1 milligramme par vingt-quatre heures ! (5)

(1) BECQUEREL. *Seméiologiques des urines*. Paris, 1841. — LEHMANN. *Lehrbuch der physiol. Chemie*, 1842, t. II, p. 346.

(2) BIDDER et SCHMIDT, 1852. — MAGNIER, 1875. — HAMBURGER, 1876 et 1878.

(3) SOCIN. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 1891, t. XV.

(4) L. LAPICQUE. Soc. chimique de Paris. 8 février 1895.

(5) *Arbeiten der pharmakol. Institutes zu Dorpat*, VII, 1891.

Une fois encore, en demandant la permission de renvoyer plus loin la discussion, j'admettrai que ce sont les chiffres anciens qui sont trop forts.

L'urine ne contient donc que des traces de fer ; à la vérité, ces traces ne manquent jamais ; une si petite quantité ne montrerait qu'une mutation bien peu importante du fer organique. Mais on n'est pas en droit de conclure que l'organisme n'en élimine pas davantage. En effet, le rein n'est pas la voie d'excrétion du fer. Si on injecte directement dans les vaisseaux une certaine quantité d'un sel de fer, on voit presque tout de suite du fer apparaître dans l'urine ; mais cette élimination n'a lieu que pendant un temps relativement court, pendant la première heure qui suit l'injection ; passé ce temps, l'urine ne contient plus de fer, et pourtant la quantité éliminée ne représente qu'une petite fraction du fer injecté, en moyenne un vingtième, soit, par exemple 2 ou 3 milligrammes pour 50 milligrammes injectés (1).

Qu'est devenu le reste de ce fer ? Une partie au moins s'est fixée dans les tissus et principalement dans le foie (2). D'autre part, les animaux qui ont reçu l'injection présentent souvent au bout de quelques heures une diarrhée qui doit faire penser à une élimination par l'intestin.

Cette hypothèse est en effet confirmée par diverses observations. BUCHHEIM et MAYER, dès 1850, ont trouvé quelques heures après l'injection d'un sel de fer dans la jugulaire d'un animal à jeun, l'épithélium intestinal couvert d'une sécrétion riche en oxyde de fer (3). KÖLLIKER et MULLER (4) retrouvèrent dans le contenu de l'estomac et de

(1) JACOBY. Diss. inaug., Strasbourg, 1887, et *Arch. f. exp. Path. und Pharm.*, 1891, t. XXVIII. — L. LAPICQUE. *Archives de Physiologie*, avril 1895.

(2) GOTTLIEB. *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 1891.

(3) Cité par BUNGE, *op. cit.*, p. 89.

(4) *Verhandl. der physik. medicin. Gesellschaft zu Würzburg*, t. VI, 1856.

l'intestin presque tout le fer qu'ils avaient injecté à un chien. Mais l'étude de l'excrétion par le tube digestif est autrement compliquée que dans le cas de l'urine, à cause des résidus de la digestion qui viennent constamment se mêler aux sécrétions. QUINCKE (1) sur un animal auquel il avait fait l'opération de Thiry (c'est-à-dire séparé du canal digestif une anse intestinale qu'on laisse en rapport avec ses vaisseaux et ses nerfs et dont on fait déboucher une extrémité au dehors), injecta dans les veines du lactate de fer sans que l'anse intestinale mise à l'abri du passage du bol alimentaire excrétât du fer. La question a été fort discutée et semble finalement devoir être résolue par l'affirmative.

C'est donc du côté de l'intestin qu'il convient de rechercher s'il existe une élimination normale de fer organique. Cette élimination était admise comme très probable. BINDER et SCHMIDT (2) étudiant les échanges d'un chat à jeun avaient trouvé dans les selles de cet animal une quantité notable de fer. Les mêmes objections, les mêmes difficultés, plus grandes encore que dans les cas précédents, se produisent pour l'étude de cette excrétion ferrugineuse normale. La démonstration de sa réalité paraît pourtant avoir été donnée par les recherches de F. VOIT (3).

Cet auteur a eu recours à l'ingénieuse opération de HERMANN, opération qui a fait faire tant de progrès à nos connaissances sur les fonctions sécrétoires de l'intestin; elle consiste à sectionner une certaine longueur de l'intestin grêle et à réunir le bout supérieur au bout inférieur pour rétablir le cours des matières, comme dans l'opération de Thiry; mais le segment séparé, laissé en connexion avec

(1) *Archives de Du Bois-Raymond*, 1868.

(2) *Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel*, Mitau und Leipzig, 1862.

(3) *Zeitschr. f. Biologie*, XXIX, 1890.

son mésentère, est refermé sur lui-même en forme d'anneau et replacé dans la cavité abdominale qui est refermée. Les fonctions du segment isolé sont ainsi beaucoup mieux conservées que dans l'opération de Thiry. Si au bout d'une vingtaine de jours on sacrifie l'animal, on trouve ce segment rempli de la sécrétion intestinale pure; or cette sécrétion contient une notable proportion de fer jusqu'à 0,23 de fer p. 100 de substance sèche; en calculant du segment isolé à la totalité de l'intestin grêle, on trouve une élimination quotidienne de 8 à 12 milligrammes pour des chiens de 20 à 30 kilogrammes.

Si l'organisme élimine chaque jour du fer, il faut qu'il en absorbe une quantité équivalente par le tube digestif. La porte d'entrée et la porte de sortie étant ici les mêmes, on voit à quelles difficultés va se heurter l'étude de cette assimilation. En fait, on n'a pas réussi à s'entendre sur cette question qui préoccupe à juste titre et les physiologistes et les médecins. Les discussions du récent Congrès de Munich en sont la preuve. Je dirai même qu'on s'entend de moins en moins.

Il y a quelques années, en effet, les physiologistes s'étaient mis presque unanimement d'accord sur ce point, que les composés minéraux du fer ne sont pas absorbés; du moins, si la chose n'était pas démontrée, elle paraissait au plus haut point vraisemblable (1). La pierre angulaire de cette opinion était l'expérience de HAMBURGER qui, faisant ingérer à un chien une certaine quantité de sulfate ferreux, n'en voyait passer dans les urines qu'une quantité négligeable et retrouvait au contraire la totalité du fer ingéré dans les fèces (2).

(1) Voir là-dessus le *Lehrbuch* de BUNGE et l'article de LAMBLING dans le *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1890, qui donne un exposé très clair de l'état de la question à cette date.

(2) *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, t. II, 1878.

Il n'y avait pas à chercher si un autre sel de fer se comporterait autrement; les doubles décompositions qui ont lieu nécessairement dans le suc gastrique, puis dans les sucs digestifs de l'intestin ramènent finalement au même point toutes les combinaisons salines du fer; les albuminates et les peptonates sont sur le même pied que les autres.

Il fallait donc chercher dans les substances alimentaires des combinaisons ferrugineuses d'un autre ordre. Cette idée de BUNGE a provoqué des recherches intéressantes.

L'hémoglobine ne pouvait pas être considérée comme répondant à la question; d'abord, elle ne peut être absorbée en nature, puisque le suc gastrique la dédouble en hématine. Sur la question de savoir si cette dernière substance est absorbée, les recherches quantitatives font défaut, mais en tout cas l'hémoglobine manque dans la nourriture de beaucoup d'animaux, des herbivores, par exemple.

BUNGE s'adressa au jaune d'œuf, qui est très riche en fer, et qui doit nécessairement contenir une substance aux dépens de laquelle se forme l'hémoglobine du petit poulet. Il réussit à obtenir une *nucléine ferrugineuse*, qui contient 0,29 p. 100 de fer, ce fer n'étant pas à l'état de combinaison saline; il ne réagit en effet aux réactifs du fer que lentement, à mesure que ces réactifs décomposent la substance. BUNGE donna à ce corps le nom d'*hématogène* (1).

Mais les expériences que fit faire BUNGE pour démontrer la valeur alimentaire de cet hématogène ne donnèrent pas des résultats absolument concluants.

Plus récemment, dans la même voie, MARFORI et SCHMIEDEBERG ont trouvé dans les tissus des animaux, spécialement dans le foie, une combinaison du fer qui présente les

(1) *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, t. IX, 1884.

mêmes particularités; ils l'ont appelée *ferratine* (1). Ils ont pu reproduire synthétiquement ce corps, qui est une combinaison d'albumine et de fer, mais non une combinaison saline, non un albuminate de fer, car la ferratine ne réagit que graduellement au sulfhydrate d'ammoniaque et aux autres réactifs du fer; elle doit être considérée comme un *acide ferri-albuminique*; sa solution soumise à l'électrolyse ne dépose pas de fer à la cathode, mais il s'y dégage de l'hydrogène. La ferratine contient de 5 à 6 p. 100 de fer. Sa préparation est devenue industrielle, et dans ces derniers temps, elle a joué un rôle souvent brillant dans la thérapeutique des anémies.

Ce dernier point ne nous indique nullement une importance spéciale au point de vue physiologique, car les médecins sont accoutumés à voir de même des guérisons se produire par l'emploi de l'un ou l'autre de ces sels de fer réputés inassimilables. Aussi les partisans de la ferratine ont cherché à démontrer qu'elle s'absorbe dans l'intestin; leurs recherches, malgré quelques contradictions qu'il faudra expliquer, semblent positives. Mais elles ont été conduites d'une toute autre manière, et avec bien d'autres précautions que les expériences par lesquelles on démontrait il y a cinq ans que les sels de fer ne sont pas absorbés. C'est qu'en effet ces expériences ne peuvent plus aujourd'hui être considérées comme démonstratives. Puisque nous savons que le fer injecté dans le sang ne s'élimine pas par l'urine, l'absence de fer dans l'urine ne peut prouver qu'il n'y a pas eu absorption par le tube digestif. Puisque c'est la muqueuse intestinale elle-même qui élimine le fer de l'organisme et que ce fer retombe aux fèces, le fait que le fer ingéré se retrouve intégralement

(1) *Arch. f. experimentelle Path. und. Pharm.*, février 1894.

dans ceux-ci ne prouve pas qu'il n'y en ait pas eu une portion quelconque absorbée, puis éliminée de nouveau. La question est à reprendre dans son ensemble.

Si l'on a eu la patience de nous suivre dans cet exposé nécessairement confus, on voit que la question physiologique du fer demande encore bien du travail avant d'être tirée au clair.

Naturellement la question pathologique et la question thérapeutique ne peuvent pas être plus avancées, puisqu'elles doivent nécessairement partir de la base physiologique qui nous manque encore. Et pourtant combien est intéressante la question de la chlorose et de son traitement. Nous sommes bien loin de l'idée très simple qui a dû guider les premières tentatives de médication martiale : il manque du fer dans le sang, vous en faites manger au malade, et tout s'arrange. S'il est incontestable que dans la chlorose, il y a un déficit de fer dans le sang, et que dans la plupart des cas, un médicament ferrugineux quelconque amène une amélioration, aussi bien le simple iodure ferreux que les préparations les plus raffinées, nous ne connaissons rien ni de la cause réelle de la lésion hématique, ni du mécanisme par lequel agit le traitement. Il ne faut pas oublier, en effet, lorsqu'on prescrit du fer, que tous nos aliments en contiennent, et que le régime ordinaire suffirait, quantitativement, en quelques jours, à combler le déficit ; nous savons, d'autre part, avec quelle rapidité un organisme sain répare les pertes d'hémoglobine que lui fait subir une saignée, tandis que certaines anémies résistent à des hectogrammes de fer. Le problème est donc certainement fort compliqué. Et nous ne pouvons même pas dire si le fer donné comme médicament est absorbé ! De bons esprits, fort au courant de la question, en sont arrivés à des solutions curieuses. BUNGE se demande

si le médecin qui prescrit le fer ne fait pas simplement une suggestion, et ROBERT admet que le fer agit dans la chlorose principalement comme caustique, en opérant une révulsion sur la muqueuse du tube digestif (1).

L'étude des problèmes que nous avons sommairement passés en revue exigera un nombre extrêmement grand d'analyses quantitatives. Il n'en va point pour la physiologie comme pour la chimie pure; ici, deux bons dosages concordants établissent le fait qu'on a en vue; là, il faut répéter un grand nombre de fois chaque constatation; nous ne pouvons pas préciser exactement, avec les animaux, les conditions du problème; dans chaque cas particulier il intervient toujours des variables que nous ne connaissons pas, et que nous ne pouvons éliminer que par la répétition des observations.

Il n'est donc pas inutile de tenir compte du temps et de la peine qu'exige un dosage: la patience de l'observateur le plus appliqué a des limites, et s'il faut deux jours de travail pour obtenir un chiffre, il est à craindre qu'on ne soit rebuté avant que d'en avoir obtenu un assez grand nombre; il est à craindre qu'on s'arrête dans son étude ou qu'on pose des conclusions sur des séries insuffisantes. Un certain nombre des contradictions que nous venons de rencontrer pourraient bien s'expliquer par cette cause psychologique.

De la plus ou moins grande facilité avec laquelle se feront les dosages, dépend donc en grande partie la rapidité des progrès de la science sur cette question.

Autre point: dans la question physiologique du fer, il est nécessaire que le dosage puisse s'appliquer à des quantités de métal extrêmement petites. Nous avons vu que le

(1) *St-Petersburg. med. Wochenschr.*, 1891, 2-14 mars, p. 75.

fer existe en proportion minime dans l'organisme ; les tissus les plus riches de l'animal adulte, le sang, n'en contiennent qu'un demi-millième au maximum. Or, on ne peut pas toujours, on peut même fort rarement opérer sur des quantités de matière première aussi grandes qu'on le voudrait. Pour étudier les variations du fer dans le sang, par exemple, au cours d'une expérience, on ne peut faire au sujet que des saignées de quelques centimètres cubes si on ne veut pas par là même troubler l'expérience ; 10 centimètres cubes sont déjà beaucoup pour un lapin si on doit renouveler la prise de temps en temps ; c'est au maximum 5 milligrammes de fer. Mais encore le dosage du fer dans le sang est celui qui se présente dans les meilleures conditions. Pour passer tout de suite à l'autre extrémité, la rate d'un chien nouveau-né, tout entière, dans les races de grande taille, pèse environ 2 grammes, et contient, d'après un assez grand nombre d'analyses que j'ai faites, quelque chose comme *un cinquième de milligramme* de fer.

Lorsque, il y a plusieurs années déjà, j'ai commencé à m'occuper de ces questions, je n'ai pas trouvé que les procédés classiques fussent satisfaisants à l'un et à l'autre de ces points de vue. J'ai cherché une méthode de dosage qui pût mieux répondre aux desiderata du problème physiologique ; je crois l'avoir rencontrée dans l'évaluation, sous des conditions bien déterminées, de la coloration des solutions ferriques par un sulfocyanate alcalin. J'ai publié sommairement le principe du procédé dès 1889 ; depuis ce temps, je m'en suis servi fréquemment et je l'ai toujours trouvé d'une application commode ; il a eu l'honneur d'être critiqué par le savant professeur d'analyse de la Sorbonne, M. Riban, et il a résisté à cette redoutable épreuve. Je désire aujourd'hui, présenter ce procédé dans son ensemble ; je

● donnerai les chiffres qui me paraissent démontrer son exactitude, et qui permettent de déterminer quel degré de précision on peut lui demander; j'indiquerai aussi le manuel opératoire qui m'a paru le plus commode pour l'appliquer aux différents cas de la physiologie et de la clinique.

Bien que j'aie eu assez peu de temps à consacrer à ces recherches, ce procédé m'a déjà permis d'obtenir quelques résultats; un certain nombre d'entre eux sont cités dans l'exposé qui précède; j'espère pouvoir continuer à m'en servir et ajouter peu à peu à ces données trop fragmentaires d'autres qui les complètent et les éclairent. Mais la science a besoin de beaucoup d'ouvriers attelés à la même besogne; tout en travaillant de mon côté à la solution de ces difficiles questions, je serais heureux de penser que la technique qui me facilite ma tâche rend à d'autres le même service.

DOSAGE VOLUMÉTRIQUE

Je crois devoir donner d'abord un exposé critique du procédé classiquement employé dans les recherches physiologiques, et cela pour deux raisons :

1° Pour tâcher de montrer que ce n'est point par fantaisie que j'ai cherché autre chose, que bien réellement, comme je l'ai dit, ce procédé ne répond pas aux conditions exigibles.

2° Parce que les résultats qu'il a fournis et ceux que j'obtiens ne concordent pas sur tous les points; il faut chercher dans ces divergences, lequel a tort et pourquoi il a tort.

La plupart des chiffres relatifs au fer de l'organisme, à peu près tous ceux antérieurs à ces dernières années, ont été obtenus par dosages volumétriques suivant la méthode de Margueritte.

Le manuel opératoire, tel qu'il a été proposé par Pelouze, est le suivant (1) :

On évapore doucement dans une capsule de platine d'un quart de litre de capacité, une quantité pesée de sang, de 100 à 130 grammes. Le résidu est calciné au rouge sombre pendant deux heures, puis épuisé à chaud par 10 centimètres cubes d'acide chlorhydrique étendus de leur poids d'eau. On ajoute ce liquide par portions que l'on transporte chaque fois à l'aide d'une pipette sur un petit filtre Berzélius installé sur un ballon gradué. Chaque épuisement est suivi d'une calcination, et ces opérations sont répétées jusqu'à ce que le charbon ait entièrement disparu. Finalement on calcine le filtre lui-même; sa cendre est traitée par l'eau acidulée, et la liqueur claire qui résulte est jointe à celle qui provient des opérations précédentes. Cette solution, étendue à 500 centimètres cubes, est additionnée d'une solution de 10 centimètres cubes d'une solution de sulfite de soude à 10 p. 100, puis chauffée et maintenue à l'ébullition pendant quelques minutes; le liquide refroidi à l'abri de l'oxygène de l'air, est étendu au litre avec de l'eau bouillie, et le sel ferreux qu'il contient est dosé à l'aide du permanganate de potasse (méthode de Margueritte).

L'examen critique de ce procédé doit se diviser en deux parties : 1^o méthode de Margueritte, conditions de son exactitude; 2^o application de cette méthode aux matières

(1) D'après LAMBLING, Thèse de Nancy, 1882, p. 18.

organiques ; les conditions précédemment posées peuvent elles être réalisées ?

1° *Dosage du fer par le procédé de Margueritte.*

Le principe est le suivant : si dans une solution d'un sel de protoxyde de fer contenant un excès d'acide, on ajoute du permanganate de potasse (caméléon) celui-ci est réduit et le sel de fer est peroxydé ; en opérant cette oxydation au moyen d'une liqueur étendue de permanganate, qu'on laisse tomber goutte à goutte dans la solution ferreuse, celle-ci reste incolore tant qu'elle contient du protoxyde ; dès qu'elle n'en contient plus, le caméléon qu'on ajoute en excès n'étant plus décomposé, donne une coloration rose.

Il est donc facile de constater le nombre de centimètres cubes d'une solution de permanganate donnée qui sont nécessaires pour peroxyder entièrement une solution ferreuse donnée ; et si l'on sait combien 100 centimètres cubes de cette solution de permanganate peuvent transformer de protoxyde de fer en peroxyde, on pourra calculer facilement combien la solution ferreuse examinée contenait de fer.

Comme on le voit, ce qui est mesuré, c'est en somme le pouvoir réducteur de la liqueur ferreuse. Pour avoir un résultat exact, il faut donc qu'à côté du protoxyde de fer on ne trouve aucun corps susceptible de réduire le caméléon.

Or une solution chlorhydrique de fer ne répond pas à la condition ci-dessus :

En effet, outre la réaction sur le fer, il se produit une réaction du permanganate sur l'acide chlorhydrique qui donne un dégagement de chlore.



Quand la liqueur est très étendue, le chlore n'a pas d'action oxydante sensible sur le protoxyde de fer; il s'établit dans le liquide renfermant le protoxyde de fer, le chlore et l'acide chlorhydrique, un équilibre variable suivant la proportion de chacun des éléments en présence, la dilution et la température (1).

Il en résulte qu'en solution chlorhydrique, le dosage par le caméléon ne donne des résultats exacts que si la solution oxydante a été titrée exactement dans les mêmes conditions que le dosage.

Si le dosage se fait sur une solution relativement moins riche en fer et plus riche en acide chlorhydrique, on aura un chiffre *trop fort*.

On évite cet inconvénient, ou la difficulté, parfois insurmontable d'opérer la prise de titre et le dosage exactement dans les mêmes conditions, en opérant en liqueur sulfurique.

La méthode suppose que tout le fer de la liqueur est à l'état de protoxyde; si au contraire on en a tout ou partie à l'état de sesquioxyde, il faut préalablement le réduire. C'est le cas qui se présente toujours en chimie biologique.

Cette réduction peut se faire, au moyen de différents réducteurs; mais comme il est nécessaire, pour être sûr d'avoir produit une réduction complète, d'employer un excès de réducteur, on ne peut se servir que des corps dont on pourra sûrement éliminer l'excès.

Les deux substances employées sont le zinc et l'acide sulfureux (sous forme de sulfite de soude).

C'est de sulfite de soude que se servait Pelouze; on chasse l'excès du réducteur par l'ébullition. Mais en pratique l'élimination des dernières traces de l'acide sulfureux en

(1) LEWENTHAL et LENSENN, *Zeitschrif. f. analyt. Chemie*, t. I, cité d'après FRÉSENIUS.

excès est fort laborieuse, aussi, d'autres auteurs lui ont substitué le zinc. Pour le zinc, en effet, l'excès s'élimine de lui-même, la réaction de l'acide de la liqueur se poursuit jusqu'au moment où tout le zinc est dissous, et les produits de la réaction terminée n'ont aucune action réductrice. Mais le zinc présente en pratique un autre inconvénient : il n'est jamais pur et contient toujours des traces de fer.

L'un comme l'autre de ces réducteurs risqueront donc de donner des chiffres *trop forts*.

Ces causes d'erreur sont évidemment peu de choses en valeur absolue : c'est pourquoi elles sont négligeables dans l'analyse d'un minerai de fer, ou dans tel autre cas de la chimie minérale, car on opère sur une quantité de fer assez grande.

Il résulte des indications données par FRÉSENUS que la quantité de fer qui lui paraît convenable pour une opération est d'environ 0 gr. 250, quantité qui doit être contenue dans 25 ou 50 centimètres cubes de liqueur ; il recommande d'autre part une solution de permanganate d'une concentration telle que pour peroxyder ce poids de fer, il faille en employer environ 25 centimètres cubes.

On comprend que dans ces conditions, une trace de réducteur en plus soit inappréciable ; on comprend même que l'erreur due à l'acide chlorhydrique ait pu passer quelque temps inaperçue.

De plus, le caméléon à ce titre est d'une puissance colorante telle qu'une seule goutte donne à un verre d'eau une belle coloration rose ; la fin de la réaction est donc d'une netteté parfaite.

Il n'en va pas de même lorsqu'on se trouve obligé d'opérer sur des quantités de fer plus faibles, et plus diluées.

« S'il faut doser le fer dans des dissolutions très

étendues », dit Frésenius, « par exemple dans des eaux minérales..., il faut préparer une dissolution de caméléon très étendue, telle par exemple, que celle qu'on obtiendrait en mélangeant 1 partie de la solution indiquée plus haut avec 9 parties d'eau ou bien en dissolvant 0,5 de permanganate cristallisé dans un litre d'eau... On en déterminera le titre directement avec une quantité correspondante et faible de fer... »

« Dans ces dernières opérations, il y a un inconvénient, c'est que pour colorer de l'eau pure acidulée il faut une certaine quantité de caméléon, négligeable, il est vrai, quand les liqueurs sont plus concentrées, mais dont il faut ici tenir compte; car on peut s'assurer que ce qu'il faut en prendre pour donner à la masse d'eau employée la teinte rose nécessaire est parfaitement mesurable (1). »

2° Application du procédé de Margueritte aux recherches biologiques.

On veut doser le fer dans un tissu, dans une sécrétion, etc., on doit d'abord se demander quelle quantité il convient d'en prendre pour se mettre dans de bonnes conditions.

On peut répondre par avance à tous les cas : le plus possible. Il est facile de comprendre, simplement d'après les généralités du chapitre précédent, que l'on n'aura jamais les 250 milligrammes des métallurgistes. C'est à peu près la quantité de fer que l'on obtiendrait par la calcination totale de trois lapins adultes. Mais, admettons qu'on ait des matériaux à discrétion, et des matériaux très riches; qu'il s'agisse, par exemple, de faire un dosage sur du sang de

(1) *Traité d'analyse chimique quantitative*, 6^e éd. française, p. 235.

bœuf : pour obtenir 250 milligrammes, il faudrait calciner un demi-litre de sang. L'opération ne laisserait pas que d'être laborieuse. Pelouze, nous l'avons vu, en prend une centaine de grammes; la calcination de cette quantité demande déjà bien du temps et du soin, comme nous le verrons; il obtient en chiffres ronds 50 milligrammes; c'est une quantité fort convenable en elle-même, mais il l'étend à un litre, et tombe déjà dans l'inconvénient que Frésenius vient de nous signaler. Néanmoins, il est évident qu'on peut, dans un tel cas, obtenir un chiffre aussi correct qu'en chimie minérale.

Examinons d'autres cas favorables au point de vue de la quantité, l'analyse de l'hémoglobine, par exemple. On n'a pas de l'hémoglobine pure, plusieurs fois recristallisée à discrétion; en sacrifier 40 grammes pour un dosage est fort joli; c'est, je crois, plus que la quantité qu'ont employée les divers auteurs, excepté les élèves de Bunge qui en ont employé bien davantage; cette quantité donne en chiffres ronds 34 milligrammes de fer d'après ceux-ci, 42 d'après ceux-là. Nous nous trouvons à peu près dans les conditions des cas précédents, c'est-à-dire qu'un fort bon dosage volumétrique est possible.

Néanmoins, les quantités de fer sont déjà petites et les causes d'erreur se feront puissamment sentir. Or, l'acide chlorhydrique se retrouve comme cause d'erreur dans tous les dosages anciens; nous ne savons pas quelle est la grandeur de cette erreur, et nous n'avons aucun moyen de l'évaluer, puisqu'elle varie suivant toutes les conditions du dosage; mais on peut affirmer qu'elle doit y être sensible; en effet, il y a une petite quantité de fer (relativement aux dosages des métallurgistes), et il y a beaucoup d'acide chlorhydrique. Pelouze n'indique que 40 centimètres cubes d'HCl pour l'épuisement du charbon; mais

il est difficile avec cette quantité de redissoudre tout le fer calciné, et les analystes en ont souvent employé davantage. « En employant pour l'extraction du fer de 100 grammes de sang 10 grammes d'acide chlorhydrique étendus de leur poids d'eau, de la manière que Pelouze indique, on n'obtient que très lentement la dissolution de tout le fer. Il m'est arrivé plus d'une fois de constater que les taches noires qui restent toujours au fond de la capsule cèdent encore un peu de fer à l'acide chlorhydrique bouillant, comme il est facile de s'en assurer à l'aide du ferrocyanure de potassium. Aussi, ai-je préféré employer du coup 20 à 30 centimètres cubes d'acide chlorhydrique que je maintiens bouillant pendant un quart d'heure environ, en ajoutant un peu d'eau à mesure que le liquide se concentre. La solution obtenue est transportée sur le filtre à l'aide de la pipette; on calcine fortement pendant quelques instants, puis on recommence l'épuisement avec la même quantité d'acide. On arrive ainsi beaucoup plus rapidement à un liquide dans lequel le ferrocyanure ne décèle plus trace de fer (1). »

Il est évident qu'un analyste soigneux ne laissera pas de fer au fond de la capsule où il a fait la calcination, tandis qu'autrefois il n'avait aucune raison de craindre d'employer l'acide chlorhydrique *largamano*, tant que la cause d'erreur due à cet acide n'avait pas été signalée.

C'est pourquoi je pense que les dosages anciens, même effectués sur des quantités notables de fer, comme dans les cas que nous venons de voir, sont entachés d'une erreur *en plus*.

Mais l'erreur est maintenant connue et peut être évitée; dans les cendres des matières animales, il est vrai, il ne

(1) LAMBLING, *op. cit.*, p. 19.

suffit pas de ne pas mettre d'acide chlorhydrique, il faut encore éliminer l'acide des chlorures qui y sont toujours contenus; la chose est facile, d'ailleurs. Voici comment on procède : on fait l'épuisement par de l'eau acidulée d'acide sulfurique; quand il est terminé, on évapore dans une capsule de platine jusqu'à consistance sirupeuse; finalement, on reprend par l'eau et on a ainsi son fer dans une liqueur qui en contient plus que de l'acide sulfurique.

En admettant que toutes les causes d'erreur soient évitées, jusqu'à quel chiffre de fer peut-on descendre sans que le procédé perde sa précision?

La limite théorique nous est donnée en considérant la quantité de permanganate qui peut exister sans être visible dans le volume de la liqueur où il faut titrer le fer. Je prendrai des chiffres à cet égard dans le travail de DAMASKIN, travail qui est on ne peut plus minutieux (1); il faut noter que l'auteur a fait tout ce qu'il a pu pour atteindre l'extrême limite de sensibilité du procédé. Le caméléon employé équivalant, suivant les cas, de 0^{mg},89 à 0^{mg},91 de fer par centimètre cube, il fallait de cette liqueur le plus fréquemment 0c.c.2 pour que sa couleur fût perceptible, toute réaction mise à part; ce chiffre me paraît donner l'hésitation de lecture, c'est-à-dire la sensibilité du procédé, et ici en valeur absolue; cette sensibilité s'arrête donc au *cinquième de milligramme de fer*, en chiffre rond, et on ne la changerait évidemment pas en diluant davantage la liqueur de caméléon. Si donc nous voulons avoir des chiffres de fer avec une approximation de 5 p. 100, seulement, il faut que la quantité totale de fer soumise à la volumétrie soit vingt fois cette plus petite valeur perceptible, c'est-à-dire 5 milligrammes.

(1) *Zur Bestimmung des Eisengehaltes des normalen und pathologischen Menschenharnes*, in *Arbeiten des pharmak. Inst. zu Dorpat*, t. VII, 1891.

C'est une quantité de fer qui peut être obtenue en physiologie dans un grand nombre de cas, et l'approximation de 5 p. 100 est à la rigueur suffisante. Mais cette approximation, nous ne l'avons qu'à la condition qu'il ne subsiste aucune cause d'erreur.

Or, il est une cause d'erreur qui paraît bien difficile à éviter, si on en juge par les discussions qu'elle a soulevées ; c'est l'erreur introduite par le réducteur, nous en avons parlé à ce propos.

Parmi les analystes qui ont cherché à faire des dosages volumétriques de ces très petites quantités de fer, les uns tiennent pour l'acide sulfureux, les autres pour le zinc, et chacun reproche au réactif qu'il n'a pas choisi de produire des erreurs inévitables.

En fait, il semble bien que d'un côté comme de l'autre, l'erreur peut être évitée, mais au prix de précautions minutieuses.

HAMBURGER, dans les recherches que nous avons plusieurs fois citées, s'était servi d'acide sulfureux. JACOBI et GOTTLIEB incriminèrent ses recherches sur ce point et firent des expériences spéciales dans lesquelles ils démontraient que par l'ébullition la plus prolongée, on ne chassait pas les dernières traces d'acide sulfureux, et que celui-ci, naturellement, agissant sur le permanganate comme réducteur, était compté comme fer et donnait une valeur trop forte.

HUPPERT intervint dans la discussion avec sa grande autorité et montra la cause du différend ; si en effet le ballon dans lequel on fait bouillir, dans un courant d'acide carbonique, la liqueur qu'on veut débarrasser de l'acide sulfureux, est fermé par un bouchon de liège ou de caoutchouc, on n'arrive pas à son but ; on parvient au contraire à éliminer tout l'acide sulfureux si, comme l'a fait Hamburger

la fermeture du ballon et l'ajutage qui donne passage à l'acide carbonique sont en verre rodé (1).

D'autre part, il est avéré que le zinc le plus pur du commerce retient toujours du fer; si l'on veut se servir du zinc comme réducteur, il faut préalablement y doser le fer, peser le zinc qu'on ajoute, et déduire le fer ainsi ajouté; encore faut-il avoir la précaution de fondre préalablement son zinc en petites gouttes pour le bien échantillonner, car le fer y est réparti d'une façon très irrégulière. C'est ce qu'a fait Damaskin, et il a trouvé dans le zinc le plus pur, soi-disant exempt de fer, 0,023 de fer p. 100; si donc on emploie 2 gr. 5 de zinc pour une réduction, c'est un demi-milligramme à déduire du résultat trouvé (2).

C'est pourquoi, si théoriquement on peut doser par le procédé de Pelouze, moyennant toutes ces précautions, 5 milligrammes de fer, en pratique, il sera prudent de doubler cette quantité, et d'opérer sur 10 milligrammes; comme les erreurs et la sensibilité sont exprimables en valeur absolue, elles deviendront relativement deux fois moindres et l'approximation sera deux fois meilleure, 10 milligrammes de fer, c'est par exemple, 20 à 25 grammes de sang, ou 50 grammes de foie de chien adulte. Le procédé est donc applicable encore dans un assez grand nombre de cas.

Mais je ne crois pas qu'il soit applicable au dosage du fer des urines, par exemple, ni en général à tous les cas dans lesquels on ne peut avoir en quantité absolue, qu'un poids bien faible de fer. Il peut même, si on veut à toute force l'appliquer dans ces cas, conduire à des erreurs très graves.

Supposons que l'une quelconque des causes d'erreurs précédentes, que nous pouvons écarter, n'ait pas été

(1) *Zeitschrift. f. physiol. Chemie*, t. XVII, 1893, p. 87.

(2) DAMASKIN, *loc. cit.*, p. 47.

écartée en fait, et qu'il reste dans la liqueur une quantité très petite d'un corps réducteur quelconque autre que le fer; une certaine quantité de permanganate sera employée à l'oxyder, et augmentera le chiffre de fer apparent d'une quantité donnée, indépendante de la quantité réelle de fer; posons par hypothèse, cette quantité égale à un demi-milligramme. Si l'opération porte sur 30 à 40 milligrammes de fer, comme dans les cas que nous avons examinés d'abord, ce demi-milligramme compté en trop ne donnera qu'une erreur insignifiante; il deviendra déjà sensible dans ce que nous avons admis comme limite inférieure de l'application du procédé, l'erreur étant alors de *un vingtième*. Mais que sera-ce lorsque la quantité totale de fer sera au plus égale à 1 milligramme? Allons plus loin encore: supposons un liquide physiologique qui ne contienne pas de fer du tout: on en prend 100 centimètres cubes qu'on évapore, dessèche, calcine, épuise, et, réduit avec toutes les précautions imaginables, sans qu'il y tombe de poussière ferrugineuse, bref, un dosage parfait, sauf la cause d'erreur que nous avons laissé subsister par hypothèse. On opère le dosage volumétrique, on constate qu'une certaine quantité de permanganate, un demi-centimètre cube de la liqueur étendue disparaît; on conclut qu'on avait 0^{mg},5 de fer dans les 100 centimètres cubes employés; en faisant le calcul, on trouve 5 milligrammes par litre pour un liquide qui n'en contient pas du tout.

C'est là le danger capital d'un mode de dosage dont le principe ne repose sur aucune réaction caractéristique du fer; en fait, il me semble qu'on est tombé dans ce danger pour ce qui concerne l'urine. Les analystes qui ont trouvé dans cette sécrétion plusieurs milligrammes par litre, ont certainement pris toutes les précautions contre les causes d'erreur connues; mais qui oserait affirmer que nous con-

naissions toutes les causes d'erreur possibles, et qu'on n'en signalera pas demain quelqu'une qui nous avait échappé, de même que nous savons maintenant nous garantir contre des erreurs que ne soupçonnaient pas nos devanciers? L'urine, il est vrai, contient du fer; on obtient sur les cendres des réactions qui, qualitativement, ne laissent aucun doute; mais lorsqu'on a cherché à doser ce fer par des procédés qui portent sans conteste sur l'espèce chimique fer, on n'est pas arrivé à des quantités mesurables. Or, si l'on regarde de près les chiffres positifs donnés par les analyses volumétriques, on voit que ces chiffres, très variables d'un opérateur à un autre, s'expliqueraient fort bien par une erreur du genre et de la grandeur de celle que nous examinions théoriquement tout à l'heure. HAMBURGER, sur un chien de 8 kilogrammes, trouve une élimination quotidienne de 3^{mg},6 de fer; l'analyse dit l'auteur, portait sur le *cinquième de la quantité journalière* (1); en partant de cette indication, qui ne nous est donnée que tout à fait incidemment, nous voyons que chaque titrage indiquait une quantité de fer voisine de 0^{mg},7. Or, DAMASKIN, qui opérait sur l'urine totale des 24 heures d'un homme, trouve pour cette élimination quotidienne de 0^{mg},5 à 1^{mg},5. Nous arrivons à ce résultat vraiment bien fait pour frapper, que ces deux observateurs, opérant avec un soin extrême, trouvent pour des quantités d'urine mises en œuvre, énormément différentes, à peu près le même résultat.

On doit donc conclure, nous semble-t-il, que le procédé de Margueritte n'est applicable avec quelque sécurité que lorsqu'on peut obtenir un certain nombre de milligrammes de fer. Et encore, après avoir vu, comme nous venons de le faire, avec quelle facilité l'erreur se glisse dans la

(1) *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, t. II, p. 199.

méthode, on n'aura jamais une satisfaction d'esprit complète avec un procédé qui vous montre qu'une certaine quantité de permanganate disparaît, mais qui ne vous fait pas toucher du doigt le fer cherché, qui ne vous le montre pas à l'œil, qui ne vous laisse pas la plus petite quantité d'un composé sur lequel vous puissiez faire des réactions de contrôle.

Et pour arriver à ce résultat peu satisfaisant, le travail à effectuer est considérable. Dans le cas le plus simple, étant donné un certain poids de substances organiques où l'on veut doser le fer, les manipulations à effectuer sont les suivantes : — Une première *dessiccation* au bain-marie, — une deuxième *dessiccation* à l'étuve; il est nécessaire que celle-ci soit complète si l'on ne veut pas avoir un boursofflement énorme, pouvant compromettre la réussite, dans l'opération suivante; — *calcination*; il faut éviter d'atteindre une trop haute température, parce que le fer au contact des chlorures, pourrait être volatilisé; — *épuisement* du charbon par de l'eau acidulée par HCl; — *lavage* du résidu; ce lavage doit être complet, car s'il restait un peu d'HCl, le danger de la volatilisation du fer se reproduirait dans l'opération suivante — *calcination* du résidu; celle-ci doit être complète, toute matière organique qui subsisterait venant plus tard fausser les résultats; il sera donc presque toujours nécessaire de la faire en plusieurs temps; — les cendres étant blanches, *dissolution* totale de ces cendres; comme on a été obligé de chauffer fortement, on a de l'oxyde ferrique calciné qui est difficile à dissoudre; — les deux liquides étant réunis, *évaporation* jusqu'à consistance sirupeuse, après addition de SO^4H^2 , de façon à éliminer tout HCl — après avoir étendu d'eau, *réduction* par le zinc ou l'acide sulfureux — *élimination* de l'excès du réducteur; ces deux dernières opérations doivent avoir

lieu dans un courant d'acide carbonique pur — enfin, *titrage* par le permanganate.

A cette série, il faut ajouter le titrage du permanganate lui-même; la solution, en effet, conserve assez mal son titre pour qu'on soit obligé de la retitrer fréquemment; ce titrage exige des précautions spéciales sur lesquelles je n'insiste pas.

DOSAGE PONDÉRAL

Les procédés pondéraux sont évidemment les meilleurs partout où l'on peut les appliquer. Pour le dosage du fer dans les recherches physiologiques, ils sont malheureusement d'une application difficile, à cause de la petite quantité de matière sur laquelle, presque toujours, on est contraint d'opérer.

La seule façon correcte de peser le fer consiste à le peser sous forme d'oxyde ferrique. Cette condition contribue ici à rendre le dosage difficile. En effet, étant donné l'acide phosphorique qu'on rencontre toujours en plus ou moins grande abondance dans ces cendres animales à côté du fer, on ne peut obtenir directement par un alcali de l'hydrate pur; il faut passer par l'intermédiaire du sulfure. Toute opération surajoutée augmente les causes d'erreur, et celles-ci, si minimes soient-elles, en valeur absolue, prennent une importance quand le résultat total se compte par milligrammes.

Le dosage par pesée d'oxyde ferrique a été employé très rarement, et seulement, à ma connaissance, pour des analyses d'hémoglobine.

HOPPE-SEYLER opérait de la façon suivante : calcination, pesée des cendres, dissolution dans HCl , addition d'acide

tartrique, d'ammoniaque et de sulfhydrate d'ammoniaque, dissolution du sulfure précipité dans l'eau régale, précipitation par l'ammoniaque. Il portait d'un poids d'hémoglobine de 2 à 5 grammes. La teneur en fer, calculée sur les données analytiques ainsi obtenues, varie de 0,42 à 0,45 p. 100. Il faut noter que ce sont les analyses ayant porté sur les plus petites quantités de matière qui conduisent à la proportion la plus élevée (1).

BUNGE dans les deux thèses qu'il a fait faire sur la composition de l'hémoglobine, thèses que nous avons citées au commencement de ce travail, celle de ZINOFFSKY à Dorpat et celle de JAQUET à Bâle, a contrôlé par une pesée les dosages volumétriques de ses élèves.

Il avait légèrement modifié le procédé de HOPPE-SEYLER et opérait de façon suivante :

Incinération de la substance, dissolution des cendres dans l'acide chlorhydrique: cette solution est saturée par l'ammoniaque jusqu'à réaction faiblement acide, on l'additionne d'acétate d'ammoniaque et on chauffe : le fer se précipite sous forme d'acétate basique et de phosphate. Le précipité filtré à chaud est lavé avec une solution chaude d'acétate d'ammoniaque, séché, calciné et pesé. Puis on le redissout dans l'acide chlorhydrique, on l'additionne d'acide tartrique et d'ammoniaque, et on précipite par le sulfhydrate d'ammoniaque. Le sulfure de fer est transformé en hydrate qui est calciné et pesé.

Bunge a opéré sur de grandes quantités de substance ; ainsi dans la thèse de Jacquet, où il s'agit d'hémoglobine de chien, l'opération a porté sur 23 gr. 658 d'hémoglobine pure et sèche ; elle a fourni 0 gr. 4126 de $\text{Fe}^3\text{O}^3 = 0,07882$ de Fe (2).

(1) HOPPE-SEYLER. *Med. chem. Unters.*, t. II, Berlin, 1867, p. 188, 189, 193 et 194.

(2) JAQUET. Thèse de Bâle, 1889, p. 12.

Dans la thèse de Zinoffsky, où il s'agissait d'hémoglobine de cheval, il avait pu prendre davantage de matière.

Dans de telles conditions on est ramené en somme aux procédés classiques de la chimie, et il n'y a rien de plus à dire d'un dosage que ce qu'en dit Frésenius. Mais les occasions sont rares, où l'on peut se placer dans d'aussi bonnes conditions; aussi Bunge, dans les nombreux dosages de fer qu'il a exécutés sur des tissus animaux ou végétaux, n'a pas cherché à obtenir de l'oxyde ferrique. Il a pesé le fer sous forme de phosphate ferrique.

Pour éviter la formation de pyrophosphate pendant la calcination, il additionne préalablement les matières d'un grand excès de carbonate de soude; puis les cendres sont reprises en solution chlorhydriques et précipitées comme dans le premier temps de l'opération précédente.

Le phosphate ferrique présente pour la pesée l'avantage, lorsqu'il s'agit de petites quantités de métal, que son poids est presque triple de celui du fer qu'il renferme. Il a l'inconvénient qu'on n'est jamais sûr de la pureté absolue du produit; c'est pourquoi Bunge, à titre de contrôle, reprend ce phosphate ferrique qu'il a pesé, le dissout dans l'acide sulfurique, et après réduction par le zinc, le titre par le permanganate. Il prend la moyenne des deux dosages.

Quand on regarde les documents analytiques que Bunge publie toujours consciencieusement à la fin de chacun de ses mémoires, on voit qu'il s'arrange autant que possible pour avoir une quantité de fer comprise entre 10 et 20 milligrammes; il ne descend que tout à fait exceptionnellement au-dessous de 5 milligrammes, de sorte qu'il a toujours sur la balance au moins une quinzaine de milligrammes; on aurait une fort bonne approximation si on était sûr des conditions de la précipitation. Mais quand on

considère les chiffres donnés par le titrage volumétrique (titrage pratiqué, nous l'avons dit, sur la substance même qui a été soumise à la pesée), on trouve entre les deux résultats des différences qui peuvent atteindre et dépasser 1 milligramme de fer; ces différences d'ailleurs ne sont généralement que de quelques dixièmes de milligramme (1).

D'autre part, la précipitation du phosphate ferrique n'est peut-être pas absolument totale, comme je l'ai vu dans des expériences personnelles que je rapporte plus loin; mais ce déficit est de l'ordre (dans mes expériences) du dixième de milligramme seulement.

En somme le procédé de Bunge, portant sur des poids de fer de l'ordre que nous avons indiqué, donne des résultats dans lesquels on peut avoir confiance.

GOTTLIEB (2) a fait ses intéressantes recherches sur l'accumulation du fer dans le foie au moyen d'un procédé qui est en usage, dit-il, dans le laboratoire de LUDWIG, on pèse le fer à l'état de *bleu de Prusse*. Je n'ai pas étudié ce procédé, et je ne puis que le mentionner.

Lorsqu'on trouve dans les auteurs des divergences sur la teneur en fer d'un tissu, les dosages ayant été effectués d'une part, volumétriquement, et d'autre part, au moyen

(1) Dans une série de recherches faites sur des embryons de cochons d'Inde et de lapins, BUNGE n'a pas pu avoir une quantité suffisante de fer, et a dû se contenter, en prenant plusieurs embryons à la fois, de 2 ou 3 milligrammes de fer (*Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 1892, p. 65). Or, dans sept dosages sur huit, c'est le chiffre donné par le titrage qui est *le plus fort*; cette différence devient significative si l'on réfléchit que, le phosphate ferrique ayant de grandes chances de retenir des traces de chaux, c'est le chiffre donné par la pesée qui devrait être trop fort. Nous retrouvons ici le fait que nous avons déjà relevé, l'exagération des résultats par le permanganate, lorsqu'on veut lui faire doser de très petites quantités de fer.

(2) Ueber die Ausscheidungsverhältnisse des Eisens. *Zeitschr. für physiol. Chemie*, t. XV. 1891.

d'une méthode pondérale qui ne comporte pas d'erreur systématique, il me semble qu'on doit, jusqu'à vérification possible, préférer les chiffres donnés par cette dernière. Avec celle-ci, tout le temps de l'opération, on voit ce qu'on fait; avec la première méthode, on en est réduit à suivre une marche donnée sur la foi des traités.

Seulement, une méthode pondérale, outre qu'elle est assez laborieuse, exige des matériaux en assez grande abondance. Je suis sûr que Bunge, dans ses intéressantes recherches sur les jeunes animaux, a été plus d'une fois arrêté par cette condition. Un jeune lapin, incinéré tout entier, ne lui fournit même pas les 10 milligrammes de fer qu'il faudrait, il est donc bien difficile de connaître la distribution de ce fer dans les différents organes. En fait, sur la question de la réserve de fer du foie, par exemple, question qui l'intéressait beaucoup, Bunge n'avait à citer qu'un chiffre pour les jeunes animaux, une analyse de Zaleski sur le foie d'un jeune chien. Il m'a été possible avec la méthode que je vais exposer maintenant, de reprendre cette question sur le lapin, animal qui offre dans les laboratoires, au point de vue de l'étude des jeunes animaux, des facilités qu'on ne peut avoir avec les animaux de plus grande taille.

DOSAGE COLORIMÉTRIQUE

Historique.

On sait que la réaction colorée des sulfocyanates alcalins sur les sels ferriques en milieu acide est extrêmement délicate et décèle des quantités infinitésimales du métal en question. On sait aussi que plus il y a de fer, plus la coloration rouge est intense. Il vient donc naturellement à l'esprit l'idée de mesurer l'intensité de cette coloration et d'en déduire, au moyen d'une relation à déterminer, le degré de concentration de la solution. Mais les vérifications les plus élémentaires démontrent immédiatement que pour une quantité donnée de fer, avec excès de sulfocyanate, la quantité du composé colorant n'est pas fixe; si on ajoute par exemple un volume d'eau distillée à un volume d'une solution rouge donnée, l'intensité de la coloration n'est pas abaissée à la moitié de l'intensité primitive, mais à une valeur sensiblement plus basse, c'est-à-dire que l'eau a dissocié le composé colorant; la relation qui lie la quantité de fer à l'intensité de la coloration dans ces conditions n'est donc pas simple; elle est peut-être même trop complexe pour pouvoir être utilisée. C'est à cause de ce fait, d'observation élémentaire, que la réaction en question a été laissée de côté par les chimistes, bien souvent tentés à cause de sa grande sensibilité de s'en servir quantitativement.

On verra très nettement l'attrait de cette réaction et les difficultés qu'il fallait résoudre pour pouvoir s'en servir en

lisant le très soigneux travail de MM. KRÜSS et MORAHT (1), paru la même année (1889) et un peu après la date où je publiais à la Société de Biologie le principe du procédé que je vais exposer. Ces auteurs ayant à doser des quantités très petites de fer, avaient cherché à l'évaluer, non pas colorimétriquement, il est vrai, mais spectrophotométriquement; mais ils ont observé que par l'adjonction d'eau à une solution de sulfocyanate ferrique, malgré la présence d'un grand excès de sulfocyanate alcalin, le *coefficient d'extinction* diminue, ils avaient remarqué également qu'en ajoutant des acides ou divers sels neutres à la solution, on abaisse son coefficient d'extinction. Or la constance du coefficient d'extinction est la condition même du dosage spectrophotométrique; ses variations prouvent la dissociation du composé colorant. Les auteurs avaient donc conclu que la réaction des sulfocyanates alcalins sur les sels ferriques ne saurait être utilisée pour l'analyse quantitative du fer. — Dans la séance de la Société de Biologie du 29 novembre 1890, j'ai fait remarquer que les recherches fort exactes d'ailleurs de MM. Krüss et Morahht ne comportaient pas cette conclusion absolument négative, que c'était faute de s'être placés dans les conditions nécessaires que ces chimistes n'avaient pas trouvé de relation fixe entre l'intensité de la coloration et la quantité de fer. Dans cette note, je précisais les conditions du dosage colorimétrique du fer, indiquées sommairement dans ma note de 1889.

Malgré ces explications, M. Riban, qui n'en avait sans doute pas eu connaissance, a repris à la Société chimique de Paris la thèse de la dissociation considérée comme objection capitale au dosage colorimétrique du fer (2). J'ai fait

(1) *Berichte der deutsch. chem. Ges.*, t. XXII, p. 2054.

(2) Décembre 1891.

voir (1), en citant mes chiffres, que cette dissociation n'a pas lieu dans les conditions où je me place. M. Riban, tout en maintenant, comme il en avait le droit, ses objections pour les cas où l'on se départirait de ces conditions, reconnut que « dans le cas restreint, tout particulier et complètement étudié » dans la note en question, mes *conclusions* restaient *intactes* (2). C'est précisément ce *cas particulier* qu'il s'agit de déterminer et de réaliser.

Avant moi, il y a un auteur qui paraît au moins après avoir approché de très près la solution. Dans les notes que j'ai publiées jusqu'ici, je ne l'ai pas mentionné, parce que je n'en avais pas connaissance. MENDES DE LÉON, en 1886, publia des dosages de fer dans le lait exécutés colorimétriquement. Ce mémoire étant publié en hollandais (3), j'ai le regret de ne le connaître que par l'analyse donnée en allemand dans les *Jahresberichte de Maly* (4). Les dosages ont été effectués de la manière suivante :

Évaporation avec quelques gouttes d'acide acétique, calcination au moufle jusqu'à cendres blanches; dissolution dans l'acide sulfurique à 20 degrés, ébullition avec un cristal de chlorate de potasse jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'odeur de chlore: dosage colorimétrique par comparaison de la couleur qui prend naissance par addition d'une quantité déterminée (5 centimètres cubes) d'une solution de sulfocyanate à 50 p. 100, dans la dissolution des cendres d'une part, d'autre part, dans une solution titrée de fer. Des expériences de contrôle, dit le compte rendu que je cite, montrèrent qu'on peut complètement, par cette

(1) *Soc. chim. de Paris*, février 1892.

(2) *Soc. chimique*, Mémoires, t. VII, 1892, p. 200.

(3) *Nederl. Tijdschr. voor Geneeskunde*, 1886, XXVIII, 297.

(4) *Jahresbericht. f. Tierchemie*, 1886, p. 145.

méthode, trouver 1 milligramme de fer dans 100 centimètres cubes de lait.

Ce travail est de trois ans antérieur à ma première note; on y trouve la condition la plus essentielle de la colorimétrie du fer au moyen du sulfocyanate, à savoir (comme on le verra dans ce qui suit) excès d'acide sulfurique et quantité déterminée de sulfocyanate. Je ne sais pas comment se faisait la comparaison des solutions colorées, et je n'ai pas les éléments nécessaires pour déterminer le degré de précision réellement atteint; en particulier, je ne sais s'il a été tenu compte des phosphates qui dans le cas du lait constituent un obstacle sérieux. En tout cas, l'auteur n'a pas, que je sache, persévéré dans cette voie, et n'y a pas été suivi. Mes essais ont été entrepris d'une façon tout à fait indépendante. Néanmoins je devais citer Mendes de Léon pour les lecteurs que les questions de priorité intéressent.

DAMASKIN de son côté, dans le travail que nous avons déjà cité (1891) a cherché à faire de la colorimétrie par le sulfocyanate. Cet auteur ne paraît pas avoir eu connaissance, ni des essais de Mendes de Léon, ni des miens. Il opérait à la façon des anciens procédés de colorimétrie du sang, c'est-à-dire en comparant, à l'œil, sans appareil, deux cuves à faces parallèles; dans l'une était placée une quantité déterminée de la solution à doser, additionnée d'une quantité déterminée d'acide chlorhydrique et de sulfocyanate alcalin; dans l'autre, la même quantité d'acide et de sulfocyanate, puis dans cette dernière on faisait tomber, par très fines gouttes, en agitant, une solution titrée très faible de fer jusqu'au moment où la coloration rose paraissait égale dans les deux cuves.

Damaskin s'était rendu compte de la plupart des causes qui l'empêchaient d'obtenir coloration égale à quantité

de fer égale, mais il n'est arrivé, malgré tous ses efforts, ainsi qu'il le reconnaît lui-même, qu'à les éliminer incomplètement (1). De plus, sa méthode de comparaison manquait de précision.

Je vais exposer maintenant la méthode que j'ai suivie, en divisant l'exposition en deux parties, comme pour la méthode volumétrique : 1° dosage colorimétrique du fer, conditions de son exactitude; 2° application de ce dosage aux recherches physiologiques.

1° Dosage du fer par la colorimétrie.

Pour deux solutions de la même matière colorante, on peut déterminer avec une grande précision le rapport des intensités de coloration au moyen de divers appareils nommés *colorimètres*. Le principe commun consiste à considérer l'une des solutions sous une épaisseur donnée, et l'autre, sous une épaisseur que l'on fait varier, l'augmentant ou la diminuant, jusqu'au moment où l'égalité de coloration existe pour l'œil. Les intensités de coloration s'expriment par l'inverse des épaisseurs :

$$\frac{I}{I'} = \frac{E'}{E}$$

Je me suis servi du colorimètre Dubosc, trop connu pour que j'aie besoin de le décrire en détail; les deux solutions à comparer sont placées dans deux petites cuves cylindriques verticales, à fond de glace horizontal; un miroir incliné, placé au-dessous, renvoie la lumière verticalement de bas en haut suivant l'axe de ces cuves; dans

(1) DAMASKIN. Op. cit., in *Arb. d. pharmak. Inst. zu Dorpat*, t. VII, 1891, p. 49 à 54.

chaque cuve, suivant le même axe, un cylindre de glace avec ses deux bases horizontales bien planes et polies, de diamètre sensiblement plus petit que le diamètre intérieur de la cuve, monte et descend par le jeu d'une crémaillère et plonge plus ou moins dans le liquide. Les rayons qui ont traversé à droite et à gauche le liquide placé au fond de la cuve et le cylindre de glace sont, au moyen de prismes, ramenés dans le champ d'un seul oculaire placé au-dessus, de telle sorte que l'œil regarde deux étendues colorées égales et contiguës, en forme de deux demi-cercles ayant le diamètre commun. On peut ainsi percevoir des différences de teintes extrêmement faibles. Comme le jeu des cylindres augmente ou diminue à volonté l'épaisseur du liquide coloré traversé par la lumière, on peut établir avec précision l'égalité de coloration des deux demi-cercles. Des échelles munies de vernier donnant en dixièmes de millimètre la hauteur de chaque cylindre au-dessus du fond de la cuve, on lit les épaisseurs e et e' .

L'emploi de cet appareil donne des résultats d'une grande précision si on prend certaines précautions.

La relation $\frac{e}{e'}$ ne sera égale à la relation $\frac{i}{i'}$ que si l'intensité de l'éclairage est exactement la même dans les deux champs. Cette condition est difficile à réaliser dans la pratique ; il est encore plus difficile de contrôler si on l'a réellement obtenue. Il vaut mieux la réaliser seulement à peu près, et procéder comme pour la double pesée, c'est-à-dire mettre successivement du même côté les deux solutions à comparer, et les rapporter toutes deux à une même épaisseur d'une solution quelconque placée de l'autre côté.

Il ne faut pas que l'éclairage varie entre les moments

des deux observations; on réalise facilement cette condition au moyen de l'éclairage artificiel. J'ai procédé comme l'indique Lambling (*loc. cit*); sur une planche longue d'environ 75 centimètres, j'ai fixé à une extrémité le colorimètre; à l'autre, une lampe à gaz; entre les deux un verre dépoli qui diffuse la lumière. Le tout est dans une chambre obscure.

Il n'est pas indifférent de faire les comparaisons avec une coloration plus ou moins intense; dans les couleurs trop accentuées, l'œil ne perçoit pas les petites différences. Il faut chercher la teinte sensible. Pour le sulfocyanate ferrique, observé à la lumière du gaz, cette teinte est un orangé qui pour un faible changement d'épaisseur vire vers le jaune ou vers le rouge.

Enfin, il faut préparer les solutions à comparer de telle sorte qu'elles présentent cette teinte sensible sous une épaisseur convenable. En effet, si la solution est trop diluée, les variations de teinte se produisent lentement avec les mouvements du piston plongeur, il y a une hésitation de lecture qui augmente avec la dilution. Si au contraire la solution est trop concentrée, la plus petite variation d'épaisseur lisible sur l'échelle du vernier correspond déjà à des écarts de coloration notables. En pratique, pour le sulfocyanate ferrique, j'ai trouvé que l'épaisseur la plus favorable est voisine de 50 dixièmes de millimètre. On arrive, avec la moindre habitude, à faire les lectures à une division près. Comme on peut répéter les lectures autant de fois que l'on veut, on peut toujours arriver à cette précision.

Nous pouvons donc déterminer la relation $\frac{i}{i'}$ à un *cinquième* près.

A-t-on le droit maintenant de conclure des intensités

colorantes aux quantités de matières colorantes dissoutes ?

Non, disent les physiciens. Une solution deux fois plus diluée qu'une autre ne donnera pas exactement la même intensité colorante si on la considère sous une épaisseur double de celle-ci. Mais l'écart est faible; et s'il est sensible pour des différences de concentration très grandes, il devient tout à fait imperceptible pour des variations de concentration peu étendues. Il faut donc s'arranger pour faire porter les comparaisons colorimétriques sur des liqueurs de concentration voisine.

Nous avons vu : 1° qu'il faut opérer toujours dans une intensité à peu près constante; 2° que les deux solutions ne doivent pas être comparées directement entre elles, mais rapportées toutes deux à une même coloration fixe. Pour ce double but, un étalon de verre coloré est d'un emploi très commode (1).

Dans ces conditions, la colorimétrie nous permettra de déterminer dans une solution colorée le poids de matière colorante dissoute. Faisons, en effet, au moyen de la même matière colorante, une solution de concentration voisine.

(1) Il n'est pas très facile de se procurer un étalon exactement de la nuance convenable. On a même voulu faire de cette difficulté une objection au procédé (Riban, *loc. cit.*) Aussi, bien que l'emploi de cet étalon ne soit nullement indispensable, je vais indiquer comment je me suis procuré celui dont je me sers. Tous les verres colorés qui se trouvent en feuilles dans le commerce sont beaucoup trop intenses, mais il y a de ces feuilles qui, par suite d'un défaut de fabrication présentent sur leurs bords des tons dégradés; en cherchant dans ces marges un rose et un jaune pâle, on arrive par la superposition de ces deux nuances à la teinte que j'indique. Pour se guider dans ce choix, on peut établir un étalon provisoire de la façon suivante : il est possible d'établir l'identité de teinte, en tâtonnant de part et d'autre, entre une solution de sulfocyanate ferrique, et une de bichromate de potasse; cette identité de coloration a lieu précisément au point cherché; on peut donc, après avoir solidifié par l'agar-agar ou la gélatine, une solution de bichromate de potasse découper dans la masse une tranche d'épaisseur convenable présentant la nuance cherchée, et transporter cette tranche chez le marchand de verre.

Soit p le poids de matière colorante par litre dans cette solution; soit e l'épaisseur sous laquelle cette solution donne la même coloration que l'étalon; soit d'autre part e' l'épaisseur sous laquelle la solution à doser présente cette coloration. Nous avons la relation $\frac{e}{e'} = \frac{x}{p}$ d'où $x = \frac{ep}{e'}$, et plus simplement si nous faisons $p = 1$, $x = \frac{e}{e'}$.

De même, il sera possible de déterminer le poids d'un élément chimique qui produit une réaction colorée, à condition que cette réaction colorée se produise proportionnellement à la quantité de l'élément en présence dans la liqueur.

Or, cette condition n'est pas toujours réalisée dans la réaction d'un sulfocyanate alcalin sur un sel ferrique, mais on peut la réaliser. C'est là-dessus que repose le dosage colorimétrique du fer. Nous allons examiner expérimentalement, en nous servant du colorimètre, comment se comporte la réaction.

Solution de sulfocyanate ferrique non titrée, rapportée à l'étalon, donne l'épaisseur 32 (en dixièmes de millimètres). Étendue de son volume d'eau distillée donne l'épaisseur 78.

Il faudrait 64; il y a donc eu dissociation. C'est là le fait connu, je n'insiste pas. J'ai observé constamment cette dissociation, quel que fût l'excès de sulfocyanate alcalin. Inversement, l'augmentation de cet excès rend toujours la coloration plus intense.

A 50 centimètres cubes d'eau contenant 1 milligramme de fer à l'état de sulfate ferrique, j'ajoute successivement d'une solution très concentrée de sulfocyanate d'ammoniaque (200 gr. pour 120 centimètres cubes d'eau) les quantités suivantes : 5,

puis 10, puis 15, puis 20 centimètres cubes. Les épaisseurs observées respectivement sont 65, 55, 50, 45.

Bien que l'excès fût déjà énorme dès la première liqueur, l'intensité colorante a été toujours en croissant.

Mais si on s'arrange de façon à avoir, dans un volume donné de liqueur, toujours la même proportion de sulfocyanate, alors les intensités colorantes sont proportionnelles aux quantités de fer. Exemple :

On fait les mélanges suivants d'une solution de sulfate ferrique, contenant 1 milligramme Fe pour 20 centimètres cubes, et d'une solution de sulfocyanate à 20 p. 100. Je mets en regard les quantités de fer réelles et celles calculées colorimétriquement.

SOLUTION ferrique.	EAU	SOLUTION sulfocyanique.	ÉPAISSEUR observée.	FER EN MILLIGRAMMES	
				introduit.	calculé.
cent. cubes.	cent. cubes.	cent. cubes.			
20	0	5	33	1,00	»
10	10	5	66	0,50	0,50
10	10	5	68	0,50	0,485
5	15	5	140	0,25	0,236
5	15	5	137	0,25	0,248

Voici une autre série de chiffres obtenue avec le chlorure ferrique, en solution très étendue, mais de titre inconnu; je fais égal à 1 le fer de la première liqueur colorée (*tableau ci-contre*).

Bien que j'aie dépassé intentionnellement dans ces séries les limites que j'indiquais plus haut, on voit que les erreurs sont peu considérables. Elles semblent systéma-

SOLUTION ferrique.	EAU	SOLUTION sulfocyanique.	ÉPAISSEUR observée.	FER EN MILLIGRAMMES	
				introduit.	calculé.
cent. cubes.	cent. cubes.	cent. cubes.			
10	10	5	34	} moyenne 32	" "
10	10	5	33		
10	10	5	32		
5	15	5	66	0,5	0,485
5	15	5	65	0,5	0,492
15	5	5	21	1,5	1,524
20	0	5	17	2,0	2,0
2	18	5	160	0,2	0,2

tiques pourtant, les chiffres plus petits que l'unité tendant à être trop faibles, les chiffres plus élevés tendant à être trop forts. (Je néglige les deux derniers, dont l'exactitude ne saurait être précise, et peut tenir à une coïncidence.)

Les solutions sont très acides ; il faut qu'elles le soient ; en effet, la solution du chlorure ferrique m'a donné les chiffres ci-dessus après avoir été additionnée de quelques gouttes d'acide chlorhydrique concentré ; avant cette addition, la même liqueur, qui rougissait à peine un papier de tournesol sensible, donnait les valeurs suivantes :

10 c. c. de solution ferrique + 10 c. c. d'eau . . . 36
5 — — — + 15 — — . . . 90

Mais à partir d'un excès assez petit d'acide, des excès croissants n'ont plus aucune influence. Exemple :

Mélange de la solution ferrique titrée, contenant déjà un excès d'acide, avec de l'eau et de l'acide sulfurique (acide concentré, 1 p. ; eau, 4 p.).

SOLUTION ferrique.	EAU	ACIDE sulfurique.	SULFOCYANATE	ÉPAISSEUR observée.
cent. cubes.				
10	10	0	5	61
10	5	5	5	60
10	0	10	5	62

Mais il n'est pas indifférent que l'acide soit de l'acide chlorhydrique ou de l'acide sulfurique.

On pèse exactement 0 gr. 500 de fil d'archal, qu'on dissout dans l'acide sulfurique; on additionne d'un excès d'acide azotique et on fait bouillir pendant quelques minutes. La solution refroidie est étendue exactement à un demi-litre. On en prélève 20 centimètres cubes qu'on étend à un demi-litre. 20 centimètres cubes de cette solution diluée, additionnée, de 5 centimètres cubes d'une solution de sulfocyanate à 10 p. 100 donnent au colorimètre une épaisseur de **58**.

0 gr. 500 du même fil d'archal sont dissous dans l'acide chlorhydrique, et additionnés de chlorate de potasse; on fait bouillir quelques minutes. La solution est étendue comme ci-dessus. 20 centimètres cubes de la solution diluée, additionnés de la même solution de sulfocyanate à 10 p. 100 donnent au colorimètre une épaisseur de **52**.

Nous ne nous occuperons plus que de la solution sulfurique. Il faut examiner maintenant l'action que peuvent exercer sur la réaction colorée des impuretés diverses; il est inutile, au point de vue qui nous occupe ici, de passer en revue toute la chimie; nous n'avons à tenir compte que des substances qui peuvent subsister dans les cendres des tissus traitées par l'acide sulfurique à chaud; il nous sera toujours possible, en effet, de nous placer dans ces conditions.

Or, les expériences directes montrent que le sulfate de soude, le sulfate de chaux, au moins en petite quantité, ne laissent percevoir aucune influence.

Mais parmi les corps qui subsistent dans la liqueur, il en est un dont il fallait particulièrement se défier, c'est l'acide phosphorique. Les traités classiques admettent même que la présence de cet acide empêche la réaction colorée du sulfocyanate ferrique. En fait, j'ai vu que de petites quantités de phosphate de soude, ajoutées à une liqueur peu acide, font baisser sa coloration. Il n'en est plus de même si on a un grand excès d'acide sulfurique. Exemple :

SOLUTION ferrique.	ACIDE sulfurique.	EAU	SULFOCYANATE	SOLUTION phosphate de soude.	ÉPAISSEUR observée.
cent. cubes.					
10	2	8	5	0	60
10	2	4	5	4	60
10	2	0	5	8	60

En titrant par l'acétate d'urane la solution de phosphate, j'ai reconnu qu'elle contenait, en chiffres ronds, 1 millig. 5 d'acide phosphorique par centimètre cube. De sorte que 6 milligrammes et 12 milligrammes d'acide phosphorique n'ont eu dans ces conditions aucune action.

Une proportion plus forte d'acide phosphorique se fait de nouveau sentir, comme on le voit dans la série suivante :

SULFATE ferrique.	ACIDE sulfurique.	SOLUTION phosphate de potasse.	EAU	SULFOCYANATE	ÉPAISSEUR
cent. cubes.	cent. cubes.				
20	2	0	5	5	68
20	2	2	3	5	68
20	2	3	2	5	70
20	2	4	1	5	72
20	2	5	0	5	73

La solution de phosphate contenait 0 gr. 0054 de P^{20} par centimètre cube.

C'est-à-dire qu'à partir de 15 milligrammes d'acide phosphorique pour 1 milligramme de fer, la coloration baisse.

Des quantités cinq fois plus considérables d'acide phosphorique ne la font, d'ailleurs, pas baisser beaucoup plus, ainsi que je l'ai vu dans d'autres expériences qu'il est inutile de rapporter ici.

En résumé, nous avons vu que la coloration est proportionnelle au fer, moyennant qu'il y ait un excès d'acide sulfurique et une proportion constante de sulfocyanate ; nous avons vu que les sulfates minéraux n'ont pas d'action, et que l'acide phosphorique lui-même n'en a pas s'il ne dépasse pas un taux assez élevé.

Nous avons vu enfin, par les chiffres mêmes des expériences, que la quantité de 1 milligramme de fer, dans 25 centimètres cubes de solution avec 50 centigrammes de sulfocyanate d'ammoniaque, présente l'intensité colorante requise pour une bonne lecture colorimétrique.

Nous allons voir maintenant comment on peut le plus commodément réaliser ces conditions dans l'analyse des tissus et des sécrétions.

2^e Application du dosage colorimétrique aux recherches physiologiques.

Examinons, comme exemple, une analyse de sang.

Il nous faut une quantité de fer voisine de 1 milligramme. D'après ce que nous savons, il faudra prendre, par conséquent, pour un dosage, environ 2 grammes de sang ; ces 2 grammes de sang contiennent en chiffres ronds 2 milligrammes d'acide phosphorique ; celui-ci ne

peut donc nous troubler et nous pouvons opérer sur les cendres totales.

Etant donnée la petite quantité de matière organique à détruire, étant donnée aussi la quantité de fer, si petite que la moindre perte conduirait à des erreurs graves, j'ai imaginé le procédé de destruction suivant, qui m'a été inspiré par la méthode de A. Gautier pour la destruction du foie en vue du dosage de l'arsenic.

La matière à analyser est placée dans un ballon en verre ordinaire, de 80 à 100 centimètres cubes. Il n'est pas nécessaire qu'elle soit desséchée ni pulvérisée. On y ajoute 2 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré exempt de fer, et on chauffe doucement sur un bec Bunsen, en tenant le ballon incliné pour éviter les projections. La matière organique, quelle qu'elle soit, se dissout dans l'acide sulfurique chaud, souvent avec une série de petites explosions, et forme bientôt un liquide goudronneux. Celui-ci ne tarde pas à foisonner, puis des gouttelettes jaillissent sur toute la surface interne du ballon, et finalement l'acide sulfurique se met à distiller du pôle inférieur au pôle supérieur de la sphère du ballon, redescendant le long des parois en filets brunâtres. Tout cela ressemble au procédé de combustion imaginé par Kjeldahl pour le dosage de l'azote. Mais, ici, sans attendre davantage, j'emploie comme oxydant l'acide azotique concentré. A cause de l'eau de la solution acide, on ne peut verser celle-ci dans l'acide sulfurique bouillant; on retire donc le ballon du feu, on laisse refroidir un peu, et on ajoute, en tenant toujours le ballon incliné, quelques gouttes d'acide azotique concentré, au moyen d'un flacon compte-gouttes. Si l'acide sulfurique est au degré de température convenable, l'acide azotique ne détermine aucune explosion, mais il se produit un foisonnement prolongé, avec dégagement de

vapeurs nitreuses. Si l'acide sulfurique était trop froid, la réaction ne se produirait pas bien et il faudrait alors réchauffer. Il y a là un tour de main qui s'acquiert avec la moindre expérience. On ajoute goutte à goutte l'acide nitrique tant que la réaction se produit, puis on replace le ballon sur le feu; généralement, la liqueur qui s'était éclaircie par l'action de l'acide nitrique jusqu'à la couleur rouge, brunit de nouveau; on recommence alors comme la première fois, puis une troisième, une quatrième fois s'il le faut, jusqu'à ce que finalement la petite quantité de liqueur placée au fond du ballon ne présente plus qu'une teinte jaune-verdâtre très claire; chauffée jusqu'à l'ébullition, ou jusqu'à la température immédiatement inférieure, lorsque l'acide distille, sans bouillir, du bas au haut du ballon, cette liqueur ne doit plus changer de couleur. Par le refroidissement elle doit devenir complètement incolore.

La combustion est alors terminée. Si le fer est en quantité notable (1 milligramme ou davantage) on aperçoit une poudre cristalline plus ou moins abondante au fond de la goutte limpide et réfringente que forme l'acide sulfurique. Ce précipité contient dans ce cas la majeure partie du fer, comme je m'en suis assuré en le séparant par décantation du liquide surnageant.

On laisse refroidir puis on ajoute une vingtaine de centimètres cubes d'eau distillée, on agite pour bien mélanger et on porte à l'ébullition pendant quelques minutes. Cette opération vise un double but : 1° dissoudre le précipité dont je parlais plus haut; cette dissolution s'accomplit entièrement sans aucune peine; 2° chasser les dernières traces d'acide nitrique et de vapeurs nitreuses que l'ébullition de l'acide sulfurique concentré ne chasse pas. Mais, après l'ébullition en présence de l'eau, ces traces ont dis-

paru, comme je m'en suis assuré à diverses reprises, notamment au moyen du sulfate de cinchonamine.

On a ainsi, sans avoir fait un épuisement ni une filtration, dans le récipient même où l'on avait pesé la matière première, c'est-à-dire sans aucune chance de perte, une solution peu étendue, parfaitement limpide et incolore ; le fer y est contenu à l'état de sulfate ferrique, en présence d'un grand excès d'acide sulfurique ; nous sommes d'emblée dans les conditions où doit s'effectuer le dosage colorimétrique. Il ne reste qu'à ajouter une quantité donnée de sulfocyanate, étendu à un volume donné, et porter au colorimètre pour faire la lecture.

Pratiquement, je procède de la façon suivante :

Le liquide est après refroidissement complet (détail important) versé dans une petite fiole dont le long col porte deux traits de jauge, l'inférieur à 20 centimètres cubes, le supérieur à 25 centimètres cubes. Le volume de ce liquide doit être sensiblement inférieur à 20 centimètres cubes. On rince le ballon avec un peu d'eau distillée qu'on reverse de même dans la fiole, et on complète le volume exactement à 20 centimètres cubes. Puis on verse jusqu'au deuxième trait de jauge une solution de sulfocyanate à 10 p. 100. On agite pour bien mélanger. Si la quantité de tissu employée était bien choisie pour donner la quantité de fer convenable, on a alors une liqueur d'un rouge intense, mais transparent, assez semblable à la coloration du vin de Bordeaux. On remplit à moitié de cette liqueur l'un des godets du colorimètre, l'autre contenant l'étalon du verre, et on établit l'égalité de teinte ; il ne reste qu'à lire sur l'appareil l'épaisseur correspondante.

On possède d'autre part une solution titrée de sulfate ferrique, préparée en dissolvant 1 gramme de fil d'archal dans de l'eau acidulée par l'acide sulfurique (celui-ci en

excès), peroxydant par l'acide nitrique, dont on chasse l'excès par une ébullition prolongée, et complétant le volume à 1 litre. De cette liqueur-mère, qui se conserve très bien, on prépare à mesure des besoins une solution à 1/20. Chaque fois que l'on a un dosage ou une série de dosages à faire (1), on titre son étalon de verre au moyen de cette liqueur vingtième. On en remplit la petite fiole jaugée à deux traits jusqu'au trait inférieur, on ajoute les 5 centimètres cubes de solution de sulfocyanate et on porte au colorimètre. L'épaisseur obtenue comme moyenne de plusieurs lectures est alors l'épaisseur 1 de la série. Le quotient de cette épaisseur par l'épaisseur observée dans chaque cas donne le poids en milligrammes du fer contenu dans le tissu mis en œuvre.

Il ne faut pas tarder à faire la lecture après la réaction du sulfocyanate; en effet, la coloration baisse peu à peu; cette diminution est très lente lorsqu'on est dans de bonnes conditions, c'est-à-dire, qu'on a environ 1 milligramme de fer dans 25 centimètres cubes; elle est plus rapide pour les colorations moins intenses.

Dans le premier cas, elle est imperceptible après un quart d'heure ou même une demi-heure; pour le second cas, voici un exemple :

Lecture faite à 2 heures	114
— à 2 h. 35	123
— à 3 h. 05	137

(1) Il ne serait pas prudent de déterminer une fois pour toutes cette valeur e de l'étalon colorimétrique; on retombe presque toujours sur la même valeur de e , mais en refaisant ce titrage en tête de chaque série de dosages, ce qui fait perdre moins de cinq minutes, on se met à l'abri des causes suivantes d'erreur possible : 1° déplacement de la source lumineuse par rapport au colorimètre ou déplacement du miroir de celui-ci (les erreurs provenant de ce chef pourraient être énormes); 2° changement de titre de la solution sulfocyanique; 3° variation de la température assez forte pour influencer la réaction colorée.

On voit que dans le cas de l'exemple, que j'ai choisi exprès avec une teneur en fer très faible, et telle qu'on doit toujours chercher à l'éviter, pour les raisons que nous avons vues plus haut, la vitesse de la décoloration est encore assez faible pour qu'on ait le temps de faire sa lecture sans erreur de ce chef.

Il est nécessaire que la liqueur résultant de la combustion soit complètement décolorée; or, il est difficile d'obtenir ce résultat avec 2 centimètres cubes d'acide sulfurique si on a à détruire 4 ou 5 grammes de tissu frais (au lieu de 2 grammes de sang que nous supposons); dans ce cas, la meilleure manœuvre consiste à prendre 4 ou 5 centimètres cubes d'acide sulfurique au début de l'opération; puis, quand elle est terminée, on incline le ballon sur un support de façon qu'il ait le col un peu déclive, et on continue à chauffer à la température voisine de l'ébullition; l'acide sulfurique distille alors goutte à goutte au dehors, on le recueille dans un verre de Bohême, et on pousse cette distillation jusqu'à ce qu'il ne reste plus que 2 centimètres cubes environ dans le ballon. Si, en effet, on garde plus de 2 centimètres cubes d'acide sulfurique dans les 20 centimètres cubes de liqueur auxquels on ajoute le sulfocyanate, il se forme peu à peu de l'acide persulfocyanique qui se précipite en jaune, et trouble la lecture.

Telle est la marche de l'opération; elle est, on le voit, simple et rapide. Il faut moins d'une heure pour la mener à bout; elle est plus longue à expliquer qu'à exécuter.

D'autre part, les manipulations nécessaires pour détruire la matière organique et obtenir la liqueur que l'on soumet au colorimètre, ne laissent guère de place pour une erreur même entre des mains peu exercées, pourvu que l'on y apporte quelque attention. La prise d'essai peut être déterminée avec toute la précision que l'on souhaite. S'il s'agit

d'un tissu cohérent, foie, rate, etc., la pesée ne présente aucune difficulté; pour le sang, rien n'est plus simple que de le faire couler directement du vaisseau dans le ballon même où se fera la combustion, après avoir taré celui-ci; de la sorte, la coagulation ne présente aucun inconvénient.

Quant à la colorimétrie elle-même, nous l'avons suffisamment examinée. Il n'est donc pas téméraire de faire un dosage sur une quantité totale aussi faible.

On peut même, quand les circonstances l'exigent, opérer sur une quantité de moitié plus faible, et conserver la même précision. On n'a, en effet, qu'à étendre la liqueur à un volume total de 10 ou 12 centimètres cubes, par exemple; cela suffit amplement à remplir le godet du colorimètre. Il suffit de faire la colorimétrie de la liqueur titrée dans les mêmes conditions, en prenant le demi-milligramme ou même moins comme unité.

Dosage dans le cas d'un grand excès de cendres et particulièrement de phosphates.

Mais on ne peut plus opérer d'une façon aussi simple, et partant, aussi sûre, lorsqu'on a affaire à un tissu ou à une sécrétion qui contient extrêmement peu de fer, par exemple, la bile ou l'urine.

Il est nécessaire, en effet, de séparer le fer de l'excès de résidus et particulièrement des phosphates qui viendraient fausser la réaction. D'autre part, la combustion dans l'acide sulfurique, étant donnée la quantité de matière relativement grande à détruire, n'est plus d'une application commode.

Quand j'ai voulu doser le fer de l'urine, voici comment j'ai procédé.

Une quantité assez grande d'urine, 200 ou 300 centi-

mètres cubes (j'ai quelquefois été jusqu'à 500) est évaporée dans une capsule de porcelaine, puis, quand elle est suffisamment concentrée, versée dans une capsule plus petite, additionnée d'un peu d'acide azotique et évaporée à siccité. On peut alors facilement effectuer l'incinération complète simplement sur le bec Bunsen, en chauffant modérément, le nitrate d'urée qui s'est formé aidant beaucoup la destruction de la matière organique; en ajoutant encore un peu d'acide azotique après avoir laissé refroidir et chauffant de nouveau, on obtient des cendres blanches.

Ces cendres sont reprises par l'eau acidifiée par l'acide sulfurique, ou mieux l'acide chlorhydrique; on verse dans un verre de Bohême, on ajoute un excès d'ammoniaque, puis on neutralise par l'acide acétique. On ajoute alors une quantité suffisante de la solution acétique d'acétate de soude telle qu'on l'emploie usuellement pour le dosage volumétrique du phosphate dans l'urine, et on met digérer au bain-marie. Le phosphate de fer se précipite sous forme de flocons jaunâtres qui se recueillent facilement sur un petit filtre Berzélius. Dès que toute la liqueur a passé par le filtre, on introduit celui-ci tout entier dans un petit ballon en verre dur, on y ajoute 3 ou 4 centimètres cubes d'acide sulfurique qui le dissolvent presque aussitôt, et on détruit totalement la matière organique par la chaleur et l'acide azotique.

On est ramené dès lors au cas précédent.

J'ai voulu savoir si la précipitation du fer, en si petite quantité, était bien complète, ou bien s'il n'y avait point dans le procédé suivi pour l'incinération quelque cause d'erreurs.

J'ai fait les expériences de contrôle suivantes :

1° 25 centimètres cubes d'une solution de phosphate de potasse, contenant 0gr,0054 de Ph^2O^3 par centimètre cube,

ont été additionnés de 20 centimètres cubes d'une solution de sulfate ferrique titrée, contenant exactement, pour ce volume, 1 milligramme de fer; la précipitation, la filtration et la destruction du filtre ayant été effectuées comme il est dit plus haut, j'ai retrouvé, par dosage colorimétrique, 0^{mgr},96.

Une deuxième opération, faite en ajoutant à la même quantité de liqueur ferrique 5 centimètres cubes d'une solution de phosphate de potasse à 0gr,054 de Ph²O⁵ par centimètre cube, a fait retrouver 0^{mg},98 de fer.

La perte, dans ces conditions, est insignifiante.

2° Dans une des liqueurs filtrées, contenant des cendres d'urine d'où je n'avais pu retirer que des traces de fer, j'ai ajouté 1 milligramme de fer à l'état de sulfate ferrique. Après précipitation, la colorimétrie a indiqué dans le précipité la présence de 0^{mgr},94 de fer.

3° Dans 300 centimètres cubes d'une urine, dont une autre proportion de même volume n'avait fourni que des traces de fer, j'ajoute 1^{mgr},25 de fer. L'analyse en donne 1^{mg},08, soit 87 p. 100 de la quantité mise.

Dans 250 centimètres cubes d'une autre urine, qui ne contenait toujours que des traces de fer, j'ajoute 0^{mgr},50 de fer. L'analyse en donne 0^{mgr},46, soit 92 p. 100 de la quantité mise.

Il y a donc perte d'un peu de fer dans la série des opérations; cette perte est voisine de 1 dixième de milligramme.

Il est à peine besoin d'ajouter que j'ai éloigné de l'endroit où je fais l'évaporation et la combustion tout ce qui pourrait abandonner des particules ferrugineuses : tous les objets employés, supports, brûleurs, pince, etc., sont en cuivre; les clous qui n'étaient pas indispensables ont été arrachés; ceux qu'il a fallu laisser, les crampons, par

exemple, qui fixent au mur les conduites de gaz, ont été recouverts d'une épaisse couche de peinture. Ces précautions, qui ne sont pas indispensables dans le cas où toute l'opération est faite en peu de temps dans un ballon, prennent une importance considérable quand on a des évaporations qui durent longtemps dans une capsule découverte. Il est toujours difficile, dans ce cas, de se protéger absolument contre les poussières ferrugineuses. BUNGE emploie dans ce but un grand carreau de vitre qui forme toit au-dessus du bain-marie.

Exemples d'analyses colorimétriques.

Ce que j'appelle ici *rapport colorimétrique* comprend les deux données expérimentales qui sont la base du calcul; on a en numérateur l'épaisseur sous laquelle la liqueur titrée présente la nuance de l'étalon; en dénominateur, l'épaisseur sous laquelle il faut prendre, dans les mêmes conditions, la solution sulfurique des cendres du tissu analysé pour obtenir cette même nuance. Le quotient donne, en milligrammes, la quantité de fer y contenue.

Foie de chien adulte. — Chien âgé d'environ trois ans, d'après l'état de la denture. Poids, 8 kilogrammes.

Tué par hémorragie. Aussitôt, l'abdomen est ouvert, une canule est introduite dans la veine porte, et l'on fait passer par le foie environ 8 litres d'une solution de sel marin à 7,5 pour mille.

Le foie, égoutté, pèse 278 grammes. Deux fragments

sont prélevés avec des ciseaux bien polis, puis introduits dans des ballons tarés.

Ballon A. $34,31 - 31,40 = 2 \text{ gr. } 91.$

Rapport colorimétrique : $40 : 82 = 0^{\text{mg}},49 \text{ Fe.}$

$0,49 : 2,91 = 0,17$ pour mille.

Ballon B. $25,72 - 21,69 = 4 \text{ gr. } 03.$

Rapport colorimétrique : $40 : 64 = 0^{\text{mg}},66 \text{ Fe.}$

$0,66 : 4,03 = 0,16$ pour mille.

Remarque. — Les quantités prélevées pour l'analyse auraient dû être plus fortes, de façon à donner un rapport colorimétrique plus voisin de l'unité.

Sang de chèvre. — Le sang qui s'écoule goutte à goutte d'une incision à l'oreille, est recueilli dans des ballons tarés.

Ballon A. $30,62 - 27,96 = 2 \text{ gr. } 66.$

Rapport colorimétrique : $42 : 41 = 1^{\text{mg}},02.$

$1,02 : 2,66 = 0,385$ pour mille.

Ballon B. $32,85 - 30,69 = 2,16.$

Rapport colorimétrique $42 : 49 = 0^{\text{mg}},86.$

$0,86 : 2,16 = 0,40$ pour mille.

Remarque. — Les globules de ce sang étaient au nombre de 18.000.000 par millimètre cube. Le volume globulaire, mesuré à l'hématocrite de *Hédin Gaertner*, était de 49 centièmes.

Sang de chien. — Jeune chien griffon. Section transversale de l'extrémité de l'artère auriculaire; on recueille du sang dans deux ballons tarés.

Ballon A. 29,60 — 27,96 = 1 gr. 64.

Rapport colorimétrique : 44 : 78 = 0^{ms},56.

0,56 : 1,64 = 0,34 pour mille.

Ballon B. 34,70 — 30,69 = 4 gr. 01.]

Rapport colorimétrique : 44 : 32 = 1^{ms},37.

1,37 : 4,01 = 0,34 pour mille.

Au même chien, trois jours plus tard, on fait une prise de sang de la même façon.

Ballon A. 30,44 — 27,96 = 2 gr. 48.

Rapport colorimétrique : 44 : 53 = 0,83.

0,83 : 2,48 = 0,33 pour mille.

Rate de jeune chat. — Jeune chat de trois semaines, pesant 345 grammes.

La rate fraîche pèse 1 gr. 165, séchée à l'étuve à toluol, elle pèse 0 gr. 240.

Introduite en totalité dans un ballon, et détruite par les acides, la liqueur claire après combustion, additionnée de sulfocyanate dans les conditions du dosage, donne une coloration si pâle qu'on n'en peut faire une lecture précise; l'égalité de teinte avec l'étalon est obtenue entre 350 et 400 dixièmes de millimètre. Le milligramme de fer donnant 35, la rate en question contenait à peu près un dixième de milligramme de fer.

Chien nouveau-né. — Chienne âgée de deux jours, pesant 440 grammes.

Tuée par décapitation. On recueille du sang qui s'écoule dans un ballon taré.

Ballon B. 29,98 — 25,81 = 4 gr. 17.

La destruction de la matière organique terminée, comme

il y a au fond du ballon un notable dépôt cristallin qui indique beaucoup de fer; comme on sait, d'ailleurs, qu'on a pris à peu près deux fois trop de sang, la liqueur est étendue à 40 centimètres cubes, dont on prend la moitié pour faire la lecture.

$$\begin{aligned}\text{Rapport colorimétrique : } 40 : 42 &= 0^{\text{mg}},95 \text{ Fe.} \\ 0,95 \times 2 : 4,17 &= 0,46 \text{ pour mille.}\end{aligned}$$

Le foie a été lavé par un courant d'eau salée dans la veine porte. Il pèse frais 20 gr. 27; après dessiccation à l'étuve à toluol, 4 gr. 44.

On prélève de ce foie sec 0 gr. 427 pour le dosage du fer.

$$\begin{aligned}\text{Rapport colorimétrique : } 35 : 42 &= 0,83. \\ 0,83 : 0,427 &= 1,94 \text{ pour mille de foie sec.}\end{aligned}$$

La rate pèse fraîche 2 gr. 02; sèche, 0 gr. 352.

Elle est mise tout entière dans un ballon pour le dosage.

$$\text{Rapport colorimétrique : } 35 : 46 = 0^{\text{mg}},22.$$

Muscles de cobaye. — Femelle adulte, tuée par décapitation. On introduit une canule dans l'aorte abdominale, et on fait passer un courant d'eau salée pour enlever tout le sang des membres postérieurs.

5 gr. 98 de muscles sont prélevés sur l'une des cuisses; on met ces muscles dans un ballon et on les détruit pour y doser le fer.

Après addition du sulfocyanate, la liqueur prend une teinte rose trop pâle pour permettre une lecture colorimétrique. Cette teinte correspond à un peu moins de *un dixième* de milligramme.

Rate de singe. — Singe mort de tuberculose intestinale.
La rate est divisée en deux, et chacune des moitiés mise dans un ballon taré, pour y doser le fer.

Ballon C. 29,67 — 27,57 = 2 gr. 10.

Après dessiccation à 110 degrés :

28,09 = 0,52.

Rapport colorimétrique : 37 : 22 = 1^{mg},68 Fe.

1,68 . 2,10 = 0,80 p. 1000.

Ballon D. 41,06 — 38,93 = 2 gr. 13.

Après dessiccation à 110 degrés :

39,46 = 0,53.

Rapport colorimétrique : 37 : 26 = 1^{mg},46.

1,46 : 2,13 = 0,69 p. 1000.

Remarque. — Deux échantillons d'une même rate, à l'inverse de ce qu'on observe pour le foie, donnent souvent des proportions de fer différentes.

Urine. — 300 centimètres cubes de l'urine d'un malade fébricitant, très colorée, sont traités de la façon que nous avons indiquée page 59. La liqueur acétique est filtrée sur un filtre Berzélius; celui-ci est détruit par les acides, etc.; le volume est ramené à 20 centimètres cubes, on ajoute 5 centimètres cubes de solution de sulfocyanate à 10 p. 100, il ne se développe qu'une coloration rose pâle.

Dans la liqueur acétique filtrée, on ajoute 20 centimètres cubes de la liqueur titrée qui sert au dosage colorimétrique, c'est-à-dire 1 milligramme de fer; on met digérer au bain-marie, puis on filtre de nouveau; le filtre est traité comme ci-dessus.

Rapport colorimétrique : 44 : 46 = 0^{mg},95.

Il y a eu 0^{mg},05 de perdu.

300 centimètres cubes d'une urine différente, traitée de la même façon, n'ont donné que des traces de fer.

On prend de cette urine 250 centimètres cubes, auxquels on ajoute 10 centimètres cubes de la solution ferrique étendue = 0^{mg},5 de fer. On répète la série des opérations.

Prenant comme unité le demi-milligramme de fer, on a :

$$\text{Rapport colorimétrique : } 80 : 86 = 0,93 \times 0,5 = 0^{\text{mg}},465.$$

Il a été perdu (en ne tenant pas compte des traces de fer préexistant dans l'urine) 0^{mg},04 de fer.

CONCLUSIONS

1° Le procédé classique pour le dosage du fer dans les matières organiques, c'est-à-dire le titrage volumétrique suivant la méthode de Margueritte après incinération de la matière, n'est exact que si l'on prend des précautions minutieuses contre diverses causes d'erreur autrefois négligées; il exige une quantité de fer minima de 10 milligrammes pour donner des résultats précis; il est long et laborieux.

Les chiffres anciens obtenus avec ce procédé sont entachés d'une erreur en plus.

2° Les procédés pondéraux sont d'une application peu facile; ils ont été rarement employés; les résultats qu'ils donnent doivent, en cas de contradiction, être préférés à ceux fournis par la méthode précédente. Ils exigent une quantité assez grande de fer pour être précis. Le travail qu'ils demandent n'est pas plus grand que celui qu'exige la méthode volumétrique correctement appliquée.

3° La réaction colorée des sulfocyanates alcalins sur les sels ferriques en solution acide permet d'évaluer avec précision de très petites quantités de fer. La lecture se fait au

colorimètre Dubosc suivant les règles générales de la colorimétrie.

L'approximation est de 1 p. 50; une quantité totale de un *demi-milligramme* suffit pour un dosage, la précision atteignant alors le *centième de milligramme*.

4° Les conditions à réaliser pour que la coloration soit exactement proportionnelle au fer (à l'état ferrique) sont : 1° concentration fixe de la liqueur en acide sulfocyanique; 2° excès notable d'acide sulfurique; 3° acide phosphorique n'excédant pas douze fois le poids du fer en réaction.

5° Les conditions, dans la plupart des cas qui se présentent en physiologie, sont réalisables d'une façon très simple avec une petite quantité de matière organique; par exemple, 1 à 2 grammes de sang. Cette matière peut être détruite totalement dans un petit ballon au moyen de l'acide sulfurique et de l'acide azotique à chaud. On obtient ainsi rapidement, sans épuisement, ni filtration, sans aucune opération donnant quelque chance de perte, une liqueur propre à l'examen colorimétrique.

La durée totale d'un dosage dans ces conditions n'excède pas une heure.

6° Dans les cas où l'on a une petite quantité de fer en présence d'un grand excès de phosphate, il est nécessaire de séparer d'abord le fer en le précipitant sous forme de phosphate ferrique; cette séparation entraîne une perte très légère.

7° Dans tout les cas où l'on ne peut avoir une quantité totale de fer n'excédant pas quelques milligrammes, le

procédé colorimétrique permet seul de doser le fer avec précision.

8° Pour la généralité des recherches physiologiques, la précision du dosage colorimétrique est amplement suffisante. Son emploi réalise une économie de temps considérable.

Vu par le Président de Thèse,

ARMAND GAUTIER.

Vu par le Doyen,

P. BROUARDEL.

Vu et permis d'imprimer :

Le vice-recteur de l'Académie de Paris,

GRÉARD.

